

METHOD AND COMPOSITION FOR THE TREATMENT OF MAMMALIAN HIV INFECTION

Patent Number: ☐ [WO9108753](#)
Publication date: 1991-06-27
Inventor(s): VOLKER ERFLE (DE); SAERMARK TORBEN (SE)
Applicant(s): STRAHLEN UMWELTFORSCH GMBH (DE)
Requested Patent: JP7005475B
Application Number: WO1990EP02127 19901207
Priority Number (s): DE19893940526 19891207
IPC Classification: A61K37/02
EC Classification: [A61K38/17](#), [C07K14/16D](#), [C07K14/435A4](#)
Equivalents: AU646652, AU6880891, BR9007904, DK504191T, ☐ [EP0504191](#) (WO9108753), [A1](#), [B1](#),
☐ [ES2048137T](#), GR93300031T, JP5504761T, KR9705329
Cited patent(s): [US3856936](#)

Abstract

A method and composition are described for the treatment of mammalian HIV infections including administering an effective subtoxic dosage of melitin to the mammal whereby the growth of HIV infected cells or the replications of the virus in the infected cells of the mammal is inhibited.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

BEST AVAILABLE COPY

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公表

⑫ 公表特許公報(A)

平5-504761

⑬ Int. Cl.³

A 61 K 37/02

識別記号

ADY

庁内整理番号

8314-4C

審査請求有

予備審査請求有

⑭ 公表 平成5年(1993)7月22日

部門(区分) 3(2)

(全 23 頁)

⑮ 発明の名称 哺乳類のHIV感染症の治療のための方法及び組成物

⑯ 特 願 平3-500651

⑰ 出 願 平2(1990)12月7日

⑱ 翻訳文提出日 平4(1992)6月5日

⑲ 国際出願 PCT/EP90/02127

⑳ 国際公開番号 WO91/08753

㉑ 国際公開日 平3(1991)6月27日

優先権主張 ㉒ 1989年12月7日 ㉓ ドイツ(DE) ㉔ P3940526.5

⑳ 発 明 者 フォルカー, エルフル

ドイツ連邦共和国, デー-8000 ミュンヘン
80, コルベルガー シュトラッセ 7

㉕ 出 願 人 ゲーエスエフ・フォルシユンクスツェントルム フュ
ア ウムベルト ウント ゲズントハイト ゲゼルシ
ヤフト ミット ベシユレンクテル ハフツング

ドイツ連邦共和国, デー-8042 ノイヘルベ
ルク, インゴルシュテットター ラントシュ
トラッセ 1

㉖ 代 理 人 弁理人 青 木 朗 外3名

㉗ 指 定 国 AT(広域特許), AU, BB, BE(広域特許), BF(広域特許), BG, BJ(広域特許), BR, CF(広域特許), CG(広域特許), CH(広域特許), CM(広域特許), DE(広域特許), DK(広域特許), ES(広域特許), FI, FR(広域特許), GA(広域特許), GB(広域特許), GR(広域特許), HU, IT(広域特許), JP, KP, KR, LK, LU(広域特許), MC, MG, ML(広域特許), MR(広域特許), MW, NL(広域特許), NO, RO, SD, SE(広域特許), SN(広域特許), SU, TD(広域特許), TG(広域特許), US

最終頁に続く

請 求 の 範 囲

1. 哺乳類におけるHIV感染症の治療のための方法であって:

該哺乳類に低毒性有効投与量のメリチンを投与せしめ、これにより、該哺乳類のHIV感染細胞におけるウイルス複製が阻害されることを含んで成る方法。

2. 哺乳類におけるHIV感染症の治療のための方法であって:

該哺乳類に低毒性有効投与量のメリチンの構造類似体を投与せしめ、これにより、該哺乳類のHIV感染細胞におけるウイルス複製が阻害されることを含んで成る方法。

3. 哺乳類におけるHIV感染症の治療のための方法であって:

該哺乳類に低毒性有効投与量のメリチン及びその構造類似体のポリペプチド混合物を投与せしめ、これにより、該哺乳類のHIV感染細胞におけるウイルス複製が阻害されることを含んで成る方法。

4. 哺乳類におけるHIV感染症の治療のための方法であって:

該哺乳類に、少なくとも1種類の膜通孔毒素、少なくとも1種類の膜通孔毒素の活性タンパク質成分、少なくとも1種類の膜通孔毒素のポリペプチド成分、及びその混合物より成る群から選ばれる薬剤を低毒性有効投与量で投与せしめ、これにより、哺乳類のHIV感染細胞におけるウイルス複製が

阻害されることを含んで成る方法。

5. 前記の薬剤がメリチンである、請求項4に記載の方法。

6. 前記の薬剤が:

ハチミツ毒素、

マルハナバチ毒素、

スズメバチ毒素、

ボールドフエスオオクマバチ毒素、

該毒素の活性タンパク質成分、

該毒素の活性タンパク質成分、及びその混合物、

より実質的になる群より選ばれる、請求項4に記載の方法。

7. 前記のメリチンの構造類似体が、連結している細胞結合性配列を有する又は有さない同親性 α ヘリックスを含む、請求項2に記載の方法。

8. 前記のメリチンの構造類似体が、Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Glyである、請求項2に記載の方法。

9. 前記のポリペプチド混合物がメリチン及びその構造類似体Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly-Glyを含む、請求項3に記載の方法。

10. 哺乳類におけるHIV感染症の治療のための方法であって:

該哺乳類に低毒性有効投与量のメリチンを投与せしめ、これにより該哺乳類におけるHIV感染細胞の増殖が阻害され

ることを含んで成る方法。

11. 哺乳類におけるHIV感染症の治療のための方法であって：

該哺乳類に低毒性有効投与量のメリチンの構造類似体を投与せしめ、これにより該哺乳類におけるHIV感染細胞の増殖が阻害されることを含んで成る方法。

12. 前記の構造類似体がAmf11及びメリチン様のGP41のペプチドである、請求項11に記載の方法。

13. 前記の構造類似体がAmf12及びメリチン様のGP41のペプチドである、請求項11に記載の方法。

14. 哺乳類におけるHIV感染症の治療のための方法であって：

該哺乳類に低毒性有効投与量のメリチン及びその構造類似体のポリペプチド混合物を投与せしめ、これにより、HIV感染細胞の増殖が阻害されることを含んで成る方法。

15. 哺乳類におけるHIV感染症の治療のための方法であって：

該哺乳類に、少なくとも1種類の膜結合毒素、少なくとも1種類の膜結合毒素の活性タンパク質成分、少なくとも1種類の膜結合毒素のポリペプチド成分、及びその混合物より成る群から選ばれる薬剤を低毒性有効投与量で投与せしめ、これにより、哺乳類におけるHIV感染細胞の増殖が低められる、又は阻害されることを含んで成る方法。

16. 前記の薬剤がメリチンである、請求項15に記載の方法。

の方法であって：

該哺乳類に低毒性有効投与量のメリチンの構造類似体を投与せしめ、これにより、該哺乳類のレトロウイルス感染細胞におけるウイルス複製が阻害されることを含んで成る方法。

23. 哺乳類におけるレトロウイルス感染症の治療のための方法であって：

該哺乳類に低毒性有効投与量のメリチン及びその構造類似体のポリペプチド混合物を投与せしめ、これにより、該哺乳類のレトロウイルス感染細胞におけるウイルス複製が阻害されることを含んで成る方法。

24. 哺乳類におけるHIV感染症の治療のための方法であって：

該哺乳類に、少なくとも1種類の膜結合毒素、少なくとも1種類の膜結合毒素の活性タンパク質成分、少なくとも1種類の膜結合毒素のポリペプチド成分、及びその混合物より成る群から選ばれる薬剤を低毒性有効投与量で投与せしめ、これにより、哺乳類のレトロウイルス感染細胞におけるウイルス複製が低められる又は阻害されることを含んで成る方法。

25. 前記の薬剤がメリチンである、請求項24に記載の方法。

26. 前記の薬剤が：

- ハチミツ毒素、
- マルハナバチ毒素、
- スズメバチ毒素、
- ボールドフスオオクマバチ毒素、

17. 前記の薬剤が：

- ハチミツ毒素、
- マルハナバチ毒素、
- スズメバチ毒素、
- ボールドフスオオクマバチ毒素、
- 該毒素の活性タンパク質成分、
- 該毒素の活性タンパク質成分、及びその混合物、

より実質的になる群より選ばれる、請求項15に記載の方法。

18. 前記のメリチンの構造類似体が、連結している細胞結合性配列を有する又は有さない両親媒性 α -ヘリックスを含む、請求項11に記載の方法。

19. 前記のメリチンの構造類似体が、Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Glyである、請求項11に記載の方法。

20. 前記のポリペプチド混合物がメリチン及びその構造類似体Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Glyを含む、請求項14に記載の方法。

21. 哺乳類におけるレトロウイルス感染症の治療のための方法であって：

該哺乳類に低毒性有効投与量のメリチンを投与せしめ、これにより、該哺乳類のレトロウイルス感染細胞におけるウイルス複製が阻害されることを含んで成る方法。

22. 哺乳類におけるレトロウイルス感染症の治療のため

該毒素の活性タンパク質成分、

該毒素の活性タンパク質成分、及びその混合物、

より実質的になる群より選ばれる、請求項24に記載の方法。

27. 前記のメリチンの構造類似体が、細胞結合性配列に連結している、又は連結していない両親媒性 α -ヘリックスを含む、請求項22に記載の方法。

28. 前記のメリチンの構造類似体が、Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Glyである、請求項22に記載の方法。

29. 前記のポリペプチド混合物がメリチン及びその構造類似体Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Glyを含む、請求項23に記載の方法。

30. 哺乳類におけるレトロウイルス感染症の治療のための方法であって：

該哺乳類に低毒性有効投与量のメリチンを投与せしめ、これにより、該哺乳類におけるレトロウイルス感染細胞の増殖が阻害されることを含んで成る方法。

31. 哺乳類におけるレトロウイルス感染症の治療のための方法であって：

該哺乳類に低毒性有効投与量のメリチンの構造類似体を投与せしめ、これにより、該哺乳類におけるレトロウイルス感染細胞の増殖が阻害されることを含んで成る方法。

32. 前記の構造類似体がAmf11及びメリチン様の

GP41のペプチドである、請求項31に記載の方法。

33. 前記の構造類似体がAmf12及びノリチン様のGP41ペプチドである、請求項31に記載の方法。

34. 哺乳類におけるレトロウイルス感染症の治療のための方法であって：

該哺乳類に低毒性有効投与量のノリチン及びその構造類似体のポリペプチド混合物を投与せしめ、これにより、レトロウイルス感染細胞の増殖が阻害されることを含んで成る方法。

35. 哺乳類におけるレトロウイルス感染症の治療のための方法であって：

該哺乳類に、少なくとも1種類の膜翅類毒素、少なくとも1種類の膜翅類毒素の活性タンパク質成分、少なくとも1種類の膜翅類毒素のポリペプチド成分、及びその混合物より成る群から選ばれる薬剤を低毒性有効投与量で投与せしめ、これにより、該哺乳類におけるレトロウイルス感染細胞の増殖が低められる又は阻害されることを含んで成る方法。

36. 前記の薬剤がノリチンである、請求項35に記載の方法。

37. 前記の薬剤が：

ハチミツ毒素、

マルハナバチ毒素、

スズメバチ毒素、

ボールドフェスオオクマバチ毒素、

該毒素の活性タンパク質成分、

該毒素の活性タンパク質成分、及びその混合物、

より実質的になる群より選ばれる、請求項35に記載の方法。

38. 前記のノリチンの構造類似体が、連結している細胞結合性配列を有する又は有さない両親媒性 α -ヘリックスを含む、請求項31に記載の方法。

39. 前記のノリチンの構造類似体が、Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly-Glyである、請求項31に記載の方法。

40. 前記のポリペプチド混合物がノリチン及びその構造類似体Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly-Glyを含む、請求項34に記載の方法。

明 細 書

哺乳類のHIV感染症の治療のための方法及び組成物

発明の背景

1. 発明の属する技術分野

本発明は哺乳類のHIV感染症の治療のための方法及び組成物に関し、そしてより詳しくは哺乳類宿主に導入され、そして該哺乳類のHIV感染細胞におけるウイルスの複製を制限又は実質的に阻害することがそれぞれできる膜翅類の毒素又はそのタンパク質性もしくはペプチド成分を利用する哺乳類の感染症の治療のためのこのような方法及び組成物に関する。

2. 従来技術の説明

医学者は長い間HIV感染個体の治療のための有用な方法及び組成物を探している。本明細書にてHIV感染症はHIV-1及びHIV-2感染症の両方を含むことを意図している。この観点において、本研究はHIV感染症と戦うための潜在的に有用な治療薬を探索することを目的とし、ここで該組成物はHIV感染細胞のウイルス増殖を阻害するが、しかし其大なる有害な副作用を有さないものである。より詳しくは、本研究の目的は従来のAZTの利用にとって代る治療剤である組成物を見出すことにある。ところでこの組成物は有効性ウイルス細胞のレザーバーを含む又は実質的に制限するため

の、HIV感染細胞もしくは言い換えるならHIV増殖性細胞を選択的に破壊せしめることが可能なものでなくてはならない。

理解される通り、HIVウイルスはレトロウイルスであり、従って最も適切にはRNAウイルスとして分類される。ところで、このような特定のレトロウイルスのRNAはレプリカーゼによって直接的に増殖されるのではなく、むしろ逆転写酵素の助成を有するDNA合成の介在を必要とする。理解されている通り、このDNAはRNAウイルスの増殖のための経路として働く。このDNAは宿主細胞のゲノムの中に後に一体化する。この一体化の現象はその後、新たなウイルス細胞の生産をもたらす。

低毒性(subtoxic)濃度の膜翅類の毒素又はそのタンパク質性もしくはペプチド成分を利用する本発明は、逆転写酵素を阻害せしめることによって低毒性濃度にてウイルス複製を妨害せしめること及び/又はHIV感染細胞の増殖を阻害せしめることにより、多数の長所を伴ってウイルスレザーバーを治療的に実質的になくすものとする。

名称 "METHODS AND COMPOSITIONS FOR THE TREATMENT OF HUMAN INFECTIONS EMPLOYING MEDICAMENTS COMPRISING HYMENOPTERA VENOM OR PROTEINACEOUS OR POLYPEPTIDE COMPONENTS THEREOF" (「膜翅類の毒素又はそのタンパク質性もしくはポリペプチド成分を含んで成る医薬品を利用する哺乳類の感染症の治療のための方法及び組成物」) の、1989年4月18日に承認されたBentonらの米国特許第4,822,608

号は、天然の二次薬剤、例えば膜細胞の毒素又はそのタンパク質もしくはポリペプチド成分が抗菌剤を強める作用を有することを教示している。この文献は更に、このような組成物は種々の疾患における抗ウイルス、制癌性又は抗癌作用を有することも述べている。より詳しくは、Bentonらの文献はミツバチ毒素の主成分であるメリチン (melittin) を、予め分っている感染症に対して抗ウイルス活性を有する様々な抗生物質と組合せて利用することを開示している。更にこの文献は、種々の治療的に有効な量におけるメリチンと様々な抗生物質との組合せにより相乗的な利点が見られることを教示している。

Bentonらの従来技術文献に詳細に説明されている通り、ミツバチ毒素における主成分であるメリチンは実質的に26個のアミノ酸残基を含むポリペプチドである。これらのアミノ酸残基はGly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln-アミドを含む。更に、この発明者は、メリチン類似体であって、少なくともその最後の5個のアミノ酸 (C-末端) が変換して6個のグリシン残基に置き代わられているものの直接的な作用が、メリチンに類似する治療的利点を有することを発見している。このアミノ酸類似体は、Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly の構造を有す。

従って、例えばAZTにより成し遂げられる常用のHIV治療に関連するそれぞれの有害性を更に回避しながらも、確

乳類に感染しうるウイルスのリザーバー細胞をなくす又は大いに少なくすることが可能な安全且つ有効な手段におけるHIV感染細胞の治療のための方法及び組成物が長い間所望されていた。

発明の目的及び概要

従って本発明の目的は、膜細胞の毒素又はそのタンパク質もしくはペプチド成分を利用する、哺乳類におけるHIV感染症の治療のための改善された方法及び組成物の提供にある。

本発明の他の目的は、哺乳類におけるHIV感染症の治療のためのこのような方法及び組成物であって、ここで膜細胞毒素がミツバチ (honey bee) 毒、マルハナバチ (bumble bee) 毒、スズメバチ (yellow jacket) 毒、及びボールドフェースオオクマバチ (bald faced hornet) 毒、該毒の活性タンパク質成分、該毒の活性タンパク質成分並びにその混合物より実質的になる群より選ばれる方法及び組成物の提供にある。

本発明の他の目的は、哺乳類におけるHIV感染症の治療のためのこのような方法及び組成物の提供にあり、ここで該方法は哺乳類に有効な低毒性投与量のメリチンの類似体又はそれ自体を投与せしめることにより、哺乳類のHIV感染細胞におけるウイルス複製を実質的に阻害せしめることを含んでいる。

本発明の他の目的は、哺乳類におけるHIV感染症の治療のためのこのような方法及び組成物の提供にあり、ここで該

方法は哺乳類に有効な低毒性投与量のメリチンとその構造類似体のポリペプチド混合物を投与せしめることにより、HIV感染細胞におけるウイルス細胞の複製を阻害せしめることを含んでいる。

本発明の更なる目的及び利点は、哺乳類のHIV感染を治療するための、安全且つ有効であり、そしてこのような疾患の治療のための従来の治療法のそれぞれに関連する有害性を更に回避せしめる、改善された方法及び組成物の提供にある。

図面の簡単な説明

図1はメリチン濃度に依存する未処理コントロールのパーセンテージとしての、非感染及びHIV感染細胞により得られる細胞増殖の比較を示すグラフ図である。

図2はメリチン濃度に依存する未処理コントロールのパーセンテージとしての、HIV感染Tリンパ球細胞 (KE37-1/IIβ) の培養上清液の標準細胞系と比較した逆転写酵素の活性 (RT%)、そして更には感染性 (INF%) の比較を示すグラフ図である。

図3はメリチン類似体の濃度に依存する、未処理コントロールのパーセンテージとしての、非感染及びHIV感染細胞により得られる細胞増殖の比較を示すグラフ図である。

図4は、メリチン類似体の濃度に依存する、未処理コントロールのパーセンテージとしての、HIV感染Tリンパ球細胞 (KE37-1-IIβ) の培養上清液の、標準化細胞数と比較した逆転写酵素の活性 (RT%) 及び感染性 (INF%)

を示すグラフ図である。

図5はHIVウイルスのGP41分子のカルボキシ末端領域のグラフモデルである。

図6はメリチンの濃度に依存する、未処理コントロールのパーセンテージとしての、HIV感染及び非感染細胞により得られる細胞増殖の比較を示すグラフ図である。

図7はメリチンの濃度の関数としての、感染性細胞のパーセンテージを示すグラフ図である。

図8はメリチン6の濃度に依存する、未処理コントロールのパーセンテージとしての、HIV感染及び非感染細胞により得られる細胞増殖の比較を示すグラフ図である。

図9はメリチン6の濃度の関数としての、感染性細胞のパーセンテージを示すグラフ図である。

図10はメリチン4の濃度に依存する、未処理コントロールのパーセンテージとしての、HIV感染及び非感染細胞により得られる細胞増殖のパーセンテージを示すグラフ図である。

図11はメリチン4の濃度の関数としての、感染性細胞のパーセンテージを示すグラフ図である。

図12はメリチンEの濃度に依存する、未処理コントロールのパーセンテージとしての、HIV感染及び非感染細胞により得られる細胞増殖のパーセンテージを示すグラフ図である。

図13はメリチンEの濃度の関数としての、感染性細胞のパーセンテージを示すグラフ図である。

図14はメリチンFの濃度に依存する、未処理コントロールのパーセンテージとしての、HIV感染及び非感染細胞により得られる細胞増殖のパーセンテージを示すグラフ図である。

図15はメリチンFの濃度の関数としての、感染性細胞のパーセンテージを示すグラフ図である。

図16はメリチン3の濃度に依存する、未処理コントロールのパーセンテージとしての、HIV感染及び非感染細胞により得られる細胞増殖のパーセンテージを示すグラフ図である。

図17はメリチン3の濃度の関数としての、感染性細胞のパーセンテージを示すグラフ図である。

図18はメリチン1-20の濃度に依存する、未処理コントロールのパーセンテージとしての、HIV感染及び非感染細胞により得られる細胞増殖のパーセンテージを示すグラフ図である。

図19はメリチン1-20の濃度の関数としての、感染性細胞のパーセンテージを示すグラフ図である。

図20はマストラン(mastoparan)の濃度に依存する、未処理コントロールのパーセンテージとしての、HIV感染及び非感染細胞により得られる細胞増殖のパーセンテージを示すグラフ図である。

図21はマストランの濃度の関数としての、感染性細胞のパーセンテージを示すグラフ図である。

図22はAMF12の濃度により比較した、未処理コントロールのパーセンテージとしての、HIV感染及び非感染細胞により得られる細胞増殖のパーセンテージを示すグラフ図である。

図23はAMF12の濃度の関数としての感染性細胞のパーセンテージを示す。AMF11の濃度の関数としての感染性細胞のパーセンテージは図22に示す結果と同じである。

図24はMHCベアチドの濃度により比較する、未処理コントロールのパーセンテージとしての、HIV感染及び非感染細胞により得られる細胞増殖のパーセンテージを示すグラフ図である。

図25はMHCベアチドの濃度の関数としての、感染性細胞のパーセンテージを示すグラフ図である。

図26はDMSO(溶媒コントロール)の濃度により比較した、未処理コントロールのパーセンテージとしての、HIV感染及び非感染細胞により得られる細胞増殖のパーセンテージを示すグラフ図である。

図27はDMSO(溶媒コントロール)の濃度の関数としての、感染性細胞のパーセンテージを示すグラフ図である。

図28はHOLSTベアチド(陰性コントロール)の濃度により比較した、未処理コントロールのパーセンテージとしての、HIV感染及び非感染細胞により得られる細胞増殖のパーセンテージを示すグラフ図である。

図29はHOLSTベアチド(陰性コントロール)の濃度の関数としての、感染性細胞のパーセンテージを示すグラフ図である。

図30は種々の時間間隔でメリチンの濃度により比較したP24生産のパーセンテージを示すグラフ図である。

図31は3時間目にてメリチンの濃度にて比較した細胞及び上清液におけるP24生産のパーセンテージを示すグラフ図である。

図32及び33はそれぞれメリチンの存在下において3時間及び14時間インキュベーションせしめた後の細胞と上清液におけるP24の濃度を示すグラフ図である。

図34は種々の濃度のメリチンと3時間及び14時間インキュベーションせしめた後の、それぞれの無細胞上清液中におけるP24測定へのメリチンの効果を示すグラフ図である。

図35は、マウスによる長期毒性試験を示し、より詳しくは特定の毒素の投与を開始してから種々の時間にて得られた、この毒性試験の際に用いた種々の毒素に対するマウスの有効体重を示す記録例である。

図36は毒性試験に用いた物質の投与を開始してから経過日数の関数としての、長期毒性試験におけるマウスの体重を示す記録例である。

図37は投与を開始してから種々の日数でのハチミツ毒素の利用の関数としての、個々のマウスの体重を示す記録例である。

図38は投与を開始してから種々の日数での、スズメバチ

毒素の利用の関数としてのマウスの体重を示す記録例である。

図39は投与を開始してから種々の日数での、オオクマバチ混合物毒素の利用の関数としてのマウスの体重を示す記録例である。

図40は投与を開始してから種々の日数での、スズメバチ科混合物の利用の関数としてのマウスの体重を示す記録例である。

図41はマウスについての長期毒性試験を示し、これは毒性試験に従ってハチミツ及びスズメバチ混合物の付与されたマウスの種々の解剖器官それぞれの顕微鏡試験をまとめた記録例である。

図41Aは、図40に紹介する種々のデータの解説を示す。

図42はメリチン及びその構造類似体の構造を示す。

好ましい態様の説明

材料と方法

材料

以下に詳細のKE37-1(非感染)及びKE37-1/IIβ(感染)細胞系はアメリカ合衆国におけるNIHのDr. Robert Gallows研究所より市販され、これを1ミリリットル当りペニシリン約100ユニット、ストレプトマイシン100μg及びフングゾン(Fungizone)(アンフォテリシンB)約0.25μgを含む、10%の仔牛血清を更に添加されているRPMI1640(CIBC)

の増地に増殖せしめた。下記に詳細のヒト間充組織細胞系 L C5 及び L C5-HIV は 1989 年 3 月 9 日にフランス国、パリの Collection De L' Institut Pasteur に寄託されており、それぞれ承認番号 1-842 及び 1-843 が付与されている。L C5 及び L C5-HIV 細胞系を、10% の仔牛血清の添加されている RPMI 1640 増地において増殖せしめた。

合成ペプチド

GP41 由来のメリチンペプチド及び類似体は市販されているペプチド合成装置 (Biolyne モデル、Pharmacia Biochrome, Cambridge UK) を用い、この装置 (Pharmacia Biochrome, Cambridge UK) に供給する予め秤量したアミノ酸 OPEP エステルにより合成した。この合成手法は、この装置のためのマニュアルに詳細の通り、Fmoc 手法に基づく。アシル化のレートはバイオプラス (Bioplus) ソフトウエアにより、その製造により付与されたプロトコールに従い、600nm にてアニオン色素 (アシッドバイオレット 17; ジメチルホルムアミド 100ml 及びジイソプロピルエチルアミン 0.14ml 当り 30mg) の遊離を利用してモニターした。この原理は対イオン分布モニター (Counter ion distribution monitoring: CDM) として知られ、そして Salisbury, S. A., Treemer, E. J., Davies, J. W. 及び Owen, D., E., I., A., (1990)

J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1990 頁 538-540 に詳細されている。利用するリンカーはペプチドアミドの遊離をもたらす ((ウルトロシン) Ultrasyn C, Pharmacia Biochrome, Cambridge UK)。

酸性に不安定なリンカー、ウルトロシン C (0.1mg) への第 1 のカップリングを対称無水物 (0.4mg) を用い、ジメチルアミノピリジンの添加 (0.05mg) により行った。これは、Fmoc 基の遊離により測定されるものとして、1 時間後に少なくとも 80% のカップリングをもたらし、そして未反応部位は無水酢酸を用いてキャップせしめた。その後のカップリングは、市販されている活性エステル (Pharmacia Biochrome, UK) を用い、利用したソフトウエア (上記) によって自動的に行われる CDM によって決定されるカップリング時間により行った。典型的なカップリング時間は一般に 4 倍過剰量のエステルを用いて 1 時間である。Ser を無色となるジヒドロキシベンゾトリアゾールを用いてカップルせしめた (1.5-2 時間)。Fmoc 基を 5 倍のベッド容量のピペリジン (ジメチルホルムアミド中で 20%) により除去せしめた。ジメチルホルムアミドを使用前に蒸留せしめ、アミンを含まないようにせしめた (Biolyne に関するプロトコールに詳細のジニトロフルオロベンゼン試験により測定した)。これらのカップリングは何ら特別な問題を提供せず、そして概ペプチドは高圧液体クロマトグラフィー (HPLC、以下参照) により

80% 以上の純度であった。

概ペプチドを 2% のアニソール及び 2% のエタングリコールの添加を伴ってトリフルオロ酢酸を用い、2 時間かけて樹脂から切り離し、その後エーテル沈降せしめた。このペプチドを TSK120T 逆相カラム (7.5×300mm) (Pharmacia, Sweden) における HPLC により純度 95% 以上に遠隔精製せしめた。このペプチドは、0.1% のトリフルオロ酢酸中における 0-80% のアセトニトリルの 90 分における連続勾配を用いることにより、85% のアセトニトリル (55 と 75% の間) にて典型的に溶出させた。この配列をアプライドバイオシステム (Applied Biosystem) シーケンサーにより、製造者に従うタンパク質シーケンシングにより確認した。

GP41 類似体及びマストバランの合成はメリチンについての詳細の通りに行った。利用したメリチン類似体及びその他のペプチドのリストは図 4-2 に記載した。

方法

図 1-4 をより詳しく説明すると、メリチン及びその特定の類似体を HIV 感染 T リンパ球細胞へのそれらの作用について試験した。これに関し、以下の細胞系をこの試験において利用した: KE37-1 (非感染) 及び KE37-1/II β (HTLV-III β により感染)。これらの感染細胞を試験条件のもとで 7 日間におたり、37℃ の温度及び 5% の CO₂ の存在下においてインキュベートせしめた。RPMI 1640 の培養増地 (GIBCO) を利用し、そして更にこれにペ

ニシリン約 100 ユニット、ストレプトマイシン 100 μ g 及びフンギゾン (アンフェテリシン B) 約 0.25 μ g を 1ml 当りに含む 10% の仔牛血清を添加せしめた。これは増地 100ml 当り、1ml の抗菌生物質-抗真菌溶液 (GIBCO: カタログ番号 04305240) に相当する。種々の濃度の抗生物質の存在下において、1 週間におけるインキュベーションの後、以下の試験をこの培養物について行った。第 1 の試験は MTT 試験を利用することにより提供される、HIV 感染細胞数の関数としての相対細胞濃度を測定する目的のために行った。この MTT 試験は T. Mosmann の、"Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays," *Journal of Immunological Methods*, 第 65 巻 (1983)、頁 55-63 に従い、マイクロタイタープレート中で行った。この MTT 試験は若干改良した: 10 μ l の MTT 溶液 (PBS 中に 5mg/ml の MTT を溶解し、濾過により除菌した; MTT は 3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムプロミドである) を全てのウェルに加えてある。細胞を MTT と、37℃ で 4 時間、5% の CO₂、昇温気下においてインキュベートせしめた。黄色い MTT を代謝的に活性な細胞によって青色のホルマジンへと還元する。この反応をインプロボノール中における 0.04N の HCl 200 μ l を全てのウェルに加えることにより停止させ、そしてこの色素を抽出せしめる。全てのホルマジン結晶を溶解せしめるために得られるこの溶

液を強く混合した。この溶液の吸光度を $-600\text{m}\mu$ で測定した。この吸光度はこのような条件下の細胞密度と比例する。

第2の実験はPoliexらにより詳細のPNAS77 (1980):1415-1419に見い出せる試験を改良した方法を利用することにより、処理せしめたHIV感染細胞培養物の上清液中における逆転写酵素の活性を測定するために行った。第3の試験は処理せしめたHIV感染細胞培養物の上清液の相対感染性を測定することを目的として行った。これに関し、非感染化のHIV感受性ヒト胎児肺細胞(LC5)を試験すべき培養上清液中においてインキュベートした。これに続き新鮮培養地中でのこの細胞の3日間培養を行った。次にこれらの細胞をHIV特異的タンパク質の生産について試験した。

HIVタンパク質の存在を確認する方法は血清学試験を紹介して行った。ここでは、第1抗体であるこれらのタンパク質に対する抗体及び第2抗体であるこのイムノグロブリンに特異的な抗体、そしてこれに結合している西洋ワサビペルオキシダーゼを利用している。識別化のため、抗体-抗原複合3-アミノエチルカルボゾールを利用した。この物質は水に不溶性であった。この方法は間接的イムノペルオキシダーゼ比色法としてよく知られる。この方法はMellierらの“HTLV-III/LAV-Antikörperkreat: indirekte Immunoperoxidasefärbung (HTLV-III/LAV抗体試験: 間接的イムノペルオキシダーゼ染色) AIDS-FORSCHUNG

まとめると、図1-4に示す試験データは、メリチンが低毒性程度で逆転写酵素を阻害することにより、ウイルス複製を阻害するための治療に有用であることが考えられることを示す。更に、メリチンはHIV感染細胞の増殖を選択的に阻害するものと考えられ、このことは哺乳類におけるウイルスリザーバーの減退を可能とする。

図1から4に示す試験結果を更に裏付けするために更なる試験を行った。図6から84迄を参照することにより最もよく説明されるこれらの試験それぞれにおいて、メリチンがHIV感染細胞を阻害する考えられるメカニズムを調べた。序論により及び図5をより詳しく参照することにより、HIVタンパク質GP41の表面のエネルギー最小化試験を、ニューラルネットワークコンピューティング(neural network computing) 原理に基づく二次構造予測におけるCHARMプログラムを用いて行った。ここで利用するニューラルネットワークプログラムの用途はアミノ酸配列からの予測二次タンパク質構造であることが理解されるべきである。このネットワークはアミノ酸残基を3つの型の二次構造、即ち、アルファヘリックス、ベータシート及びランダムコイルに分けるようになっている。既知の二次構造を有するタンパク質の大量のセットをこれに教え込むことにより、このニューラルネットワークはこのネットワークによって新規なるタンパク質の二次構造について、その一次構造に単に基ついて予測することが可能となる。ヒト免疫不全ウイルス(HIV)タンパク質GP41)の、ニューラルネ

(AIFO) 1986年2月、第2巻、頁105-107に詳細されている。図1-4に見られる通り、メリチンは $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度でHIV感染細胞及び非感染細胞両者に毒性であることがわかる。これに関連して、本試験データの分析を更に補助するためにマウスに対する毒性試験を以降に提供する。以上の他、図3に示される通り特定のメリチン類似体は明らかにメリチンほど毒性でない。しかしながら、この類似体はより高い投与量、即ち $10\mu\text{g}/\text{ml}$ でHIV感染細胞に対して選択的な増殖阻害作用を示す。更に、メリチンが感染及び非感染細胞の両者に毒性である濃度 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ にて、感染細胞の増殖はメリチンを利用することによりおよそ7日後には80%下がるが、非感染細胞の増殖は容易には影響を受けないことを本発明者が発見したことに注目すべきである。

以上の他、図1-4に示す試験データは、 $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度のメリチンを示し、これでは細胞の増殖のレベルは未だ影響されず、この細胞の増殖する能力及び逆転写酵素の活性はほぼ0値に近接することが明らかである。これは図2を参照することにより最もよく分る。

図4を参照することにより最もよく分る試験データは、
ノリチン類似体が逆転写酵素の活性及び上清液処理化HIV
感染細胞における感染性ウイルス細胞の量も低めることが
できることを示す。この作用は非感染細胞には毒性でないが、
HIV感染細胞には明らかに毒性である温度範囲において生
ずるものと考えられる。

ネットワーク法に基づくコンピューターモデル化による分析は、H. Andrus senらの "Analysis of the Secondary Structure of the Human Immunodeficiency Virus (HIV) Proteins gp17, gp120 and gp41 by Computer Modeling Based on Neutral Network Methods," Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes、第3巻、頁615-622に見い出せる。より詳しくは、これらの研究により導かれる考察は、GP41タンパク質の2つのトランスメンブランセクションがメリチンの構造とある程度を同一性を有することを示唆している。これに関して、この同一性はかなり注目すべきであり、その理由はメリチンとはかなり異なっているその他のメリチンの類似体と同じHIV阻害作用を有することが明らかであるからである。従って、メリチンにおけるいくつかのアミノ酸は、両親媒性が保持されることを条件に該分子の活性の変化を伴うことなく交換されることができ、そして4つのメリチン分子のポリマー化が荷電相互作用により可能であることが明らかである。これらのデーターから導かれる考察であって以降により詳しく説明することは、即ち、メリチンは主なHIVタンパク質のうちの1つ、跨膜タンパク質GP41と相互作用するものと考えられることである。これは、GP41のトランスメンブラン領域とメリチンが図5に示す通り関係する理由により考えられる。

メリチンはアミノ酸25個分の長さの両親媒性ペプチドであると考えられる。高いイオン強度の水溶液中では、メリチンは4量体の構造を選択する。しかしながら、低いイオン強度

ではメリチンはモノマーのランダムコイルとなる。生理的なイオン強度ではこの2つの型の分布が等しくなるようである。従来の研究が示すには、メリチンはモノマーヘリックスを形成せしめることにより細胞膜の疎水環境に適合することができるとを示している。このヘリックスの一方の側面には電荷が分布し、そして膜に結合している側面には電荷は負荷されていない。この研究は、メリチンポリマーの表面がまわりの脂質に向いており従って電荷が負荷されていないことを更に示唆する。更に、メリチン分子のその他の特有な特徴は、約120°のねじれがプロリン(アミノ酸番号14)によってこのメリチンヘリックスに導入されていることである。類似のねじれが上記のHIV GP41メリチン模配列に見い出せる。

初期の研究は、メリチンがいくつかの作用を有することで知られていることを示す。これらの作用は細胞表面結合プロセス及び重合プロセスとしてより詳細され、ここではアルファヘリックスはチャンネルを形成するように配置している。更に、C末端、即ち尾部の6個のアミノ酸によって結合することは細胞溶解のために重要であることが示されている。この事実はいずれに詳細する実験的試験データを理解する上で非常に重要である。メリチンがチャンネルを形成する正確なメカニズムはよく理解されていないことが理解されるべきである。しかしながら、メリチン分子はその塩基性C末端によってリン酸陰イオンと結合することが考えられ、これによって10個のホスファチジルコリン分子と相互作用する。メリ

チン分子が結合したら、これは膜の外脂質層の中に入り込み、これによって膜の構造を乱すと考えられる。この働きに続き、膜の外層に孔が形成され、これによりイオンの透過性は高められ、その後膜は破れる。この膜において形成されるチャンネルはメリチン分子により安定化される。チャンネルの形成は細胞の溶解をもたらす。これは以降のメリチンの毒性に関連する。これはアルファトキシン及び補体が細胞毒性であるメカニズムと比較することができる。これらの分子は膜に広がることもでき、これによって同じ結果をもたらす孔が形成される。

チャンネル形成能力を含む両親水性ペプチドの作用に加え、ホスホリパーゼA2における作用が詳細され、これも二種のタンパク質間の両親水性相互作用を含む。このケースにおいて、メリチンはおそらく酵素タンパク質ホスホリパーゼA2の疎水部分と相互作用するか、又はそれはメリチン-リン脂質相互作用に起因しうる。以上の他、メリチンの作用は細胞内である可能性もある。例えば、メリチンは成基ホルモンの分泌をもたらす、下流体調節剤における内因性ホスホリパーゼA2を刺激せしめることが知られる。

図6から3.4にそれぞれ示す一連の実験は両極端を調べるためにデザインされている。これらの試験は特にウイルス遊離の阻害及び/又は低められた他の細胞への感染能力を有するウイルスの遊離を調べるためにデザインされている。他の細胞に感染する低められた能力は、例えばグリコシル化阻害剤により示され、ウイルス遊離への直接的な作用はアシル化阻

害剤、RT阻害剤及びメリチンにより示される。ところで、この実験のデザインの最も重要な特徴はメリチンの毒性の検出である。本実験は星状細胞腫細胞系LC5-HIV(クローン化感染細胞)及びリンパ細胞腫細胞系KE37-1/IIIβ(HTLV-IIIβによるクローン化感染細胞)の両者において行った。両ケースにおける結果は実質的に同じであった。一連の本実験において、HIV遊離は完全自動化研究室ロボットシステムにより試験し、これはBiomek 100としてBeckman Instrumentsにより製造されている。このシステムは以下の段階を行う。第1に、慢性的に感染された細胞(クローン化)をマイクロタイタープレートにまき、そして7日間増殖させる。次に、これらをメリチンにより、図に示す期間の最終日又はその途中迄のいつれかにて作用を受けさせる。生存細胞数をMTT、即ち代謝(デヒドロゲナーゼ)試験により定量する。このMTT試験は自動で行う。毒性作用は実験時に調べ、別のコントロール実験において調べたのではない。更に、最終洗浄より24時間から7日間の様々な経過期間由来のウイルス細胞を含む上清液をこの培養物から回収し、そして抗原又はウイルスの酵素の逆転写酵素(RT)を利用するウイルス定量のためのアリコートを作成した。更に、アリコートをマイクロタイタープレート中の非感染細胞の培養物に加え、これらの非感染細胞に感染するこのウイルス細胞の能力をその後調べた。これに関連して、感染細胞の数をイムノペルオキシダーゼ染色法によって自動的に定量した。この試験結果は示した通り、メ

リチンの毒性(MTT試験);初期培養物からのHIVの遊離(RT試験);及びもとは感染されていない細胞に感染する遊離ウイルスの能力として表わした。

図6及び7を参照することにより最も分る通り、HIV感染細胞へのメリチンの全体的な作用は、感染細胞からのウイルス細胞の遊離の阻害であると考えられる(図6)。しかしその天然の型は感染細胞に選択的に作用しないようである(図7)。この関係はメリチン6(図8と9)、メリチン4(図10と11)、メリチンE(図12と13)、メリチンF(図14と15)、メリチン3(図16と17)及びメリチン1-20(図18と19)それぞれに関して示された。このデータから得られる情報は注目すべきであり、その理由はメリチンの膜への作用はメリチンのそのC末端を介しての細胞への表面結合に依存すると考えられるからである。初めに説明した通り、この結合特性はLys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln-Aspのアミノ酸配列を含むC末端配列に基づく陽電荷に依存するとも考えられる。メリチンの作用が既知のチャンネル形成のメカニズムに基づくか、又は知られていないプロセスによるものかを調べるため、本発明者は(1-20)-G-(G11)-アミドを試験した。この型のメリチンの電荷の欠如に基づき、これはその両親水性特性と同じ方法において作用し、そして細胞表面との特異的な相互反応に依存しないものと考えられていた。しかしながらこの発明者の仮説に反して、図18及び19を参照することにより最もよく分る通り、細胞表面に特異的結合せず、

そしてそれ故より毒性の低いメリチン類似体は、ウイルス細胞遊離を阻害し且つHIV感染細胞を選択的に殺傷することがはっきり認められた。この実験データは、メリチンの毒性、細胞毒性効果が感染細胞の選択的な殺傷をおそらくマスクすることを示唆する傾向にあった。これはメリチンの溶解特性がその抗-HIV作用に含まれていない可能性を予測させる。従ってこれは新規であり、且つ今迄開示されていないメリチンの作用の態様である。

更に試験結果は天然のメリチンがHIV感染しC5細胞を溶解せしめることができることを明白に示す。例えばこの試験データは、この作用の性質がこの臨界濃度の現象に関連すると考えられることを示した。より詳しくは、この臨界濃度に達している場合(10 μ g/ml)、全ての細胞、即ち、非感染及び感染細胞は殺傷される。この作用はHIV遊離における作用よりも10倍高い濃度で生ずる。メリチンCROHを試験し、そしてこれはメリチンアミドよりも効力が弱いことがわかった。以上の他、2種類のメリチン類似体を試験した。これらは位置21-26において陽電同アミノ酸の結合性尾端が欠如していた。これら両者のメリチン類似体はHIV感染細胞に同一と判断される作用を有し、即ちこれらの感染細胞は選択的に殺傷された。例えば、10 μ g/mlにて、半数の感染細胞が殺傷され、そして非感染細胞は実質的に影響を受けなかった。更に、臨界濃度での細胞溶解に基づき、メリチンの毒性として説明されることが出来る細胞の溶解は、利用した濃度において観察されなかった。メリチン類似体の

作用は類似体の濃度の上昇により、感染細胞の生存率を定常的に低下させることを示した。このメリチン類似体の作用は簡単に説明できない。即ち、感染細胞は非感染細胞と同程度に明らかに生存しており、従ってもしHIV遊離が阻害される場合、それらは非感染細胞よりも速い速度で死滅することはないであろう。更に、両親媒性構造を介して作用する、抗ウイルス物質としてのメリチンの作用はメリチン(1-20)の作用により更に実証された(それぞれ図18及び19)。これに関して、メリチン1-20はその分子の細胞結合部が欠如していることを理解すべきである。しかしながら、この類似体はそれにもかかわらず天然のメリチン及びメリチン(1-20)-6-(Gly)-アミドと同様にHIV遊離を阻害した。更にこのメリチンは、陽電荷C末端を有さないメリチン、即ちメリチン(1-20)-6-(Gly)-アミドと同様に感染細胞の増殖を阻害した。従って、メリチンの抗ウイルス作用はメリチンの既知の細胞溶解メカニズムに依存せず、むしろメリチンの両親媒性及び膜カオトロピック作用に依存すると考えられる。従い、感染細胞の選択的殺傷はHIV遊離の阻害と相関する。これは現状では推測であるが、この作用はメリチンの現在迄分っていない作用に基づくであろう。

毒性マストバランの作用も図20及び21に示す。これは両親媒性ペプチドであるが、やや短めのものと考えられ、そして14個のアミノ酸残基のみを含む。従って、これはポリマー型においてのみ膜に分散することができる。類似の構造

を有すペプチド、即ちMHC(MAJOR組織適合性複合配列)及びGP41類似体、並びにマストバランは既に明らかである作用を有していないことに注目することが重要である。更に、メリチンと明らかに構造上類似していないコントロールペプチドも作用を有さなかった。

図30及び31をより詳しく参照すると、本発明者は(細胞内におけるウイルスタンパク質24の形成を測定することにより、メリチンにより処理された感染体(クローン培養物)においてこのウイルスタンパク質合成は全体的に低められることを発見した。このことは本質的に、抗ウイルスにおけるメリチンの作用は、感染細胞から遊離する前のウイルスに攻撃することであり、しかも細胞培養物等へのメリチンの添加の最中又は直後にウイルスの数を低下せしめることが可能であることを意味する。しかしながら、この事実はウイルス生産がこの培養を開始から約3-5日かけて最大値に達することを示している。この時点において、メリチンは培養物には存在していない。更に、得られるこれらの試験はメリチンが19時間の半減期を有し、且つそれは培養物に添加して2時間を経過した後はこの培養地中において測定できない、即ち、これは細胞に取り込まれていることを示す。この観察は「細胞遊離」ウイルス、即ち、上清液に放出されたウイルスにおけるメリチンの直接的な作用によって説明される実験結果を全てを排除する。

膜遊離毒素の繰り返し投与の作用をマウスにおいて調べた。10匹のNMRIマウス(それぞれの性を5匹づつ)のグル

ープに以下の毒素を皮下的に付与した。ハチミツ、スズメバチ、オオクマバチ混合物又はスズメバチ科の混合物を0.4, 7, 12, 14及び16日目に与えた。各動物にそれぞれ1, 2, 5, 5, 10, 25及び50 μ gの毒素を投与せしめた。その後、各動物は50 μ gの毒素の注射を毎月5ヶ月にわたり受けた。第5のグループにはコントロール溶液を与え、これをコントロールとした。このデータはそれぞれ図35から41Aにまとめ、臨床観察及び体重記録を繰り返し行った。この実験の終了時に、全ての動物を解剖し、そして組織学的検査を行った。この検査の結果より、マウスはこの4種の毒素に非常に耐性であることが考えられた。異常な成長又は組織学的変化は見られなかった。

長期毒性試験に用いた材料と方法

種々の膜遊離毒素の利用

序 投

哺乳類における膜遊離毒素の繰り返し投与の効果を評価するため、長期毒性試験をマウスにおいて行った。

試験物質

以下の膜遊離の種由来の毒素を試験した:

ハチミツバチ(アピスメリフェラ: *Apis mellifera*) (ref. Nr. BV02)、

スズメバチ(ベスブラマクリフロンス) (ref. Nr. YJ02)、

オオクマバチ混合物(白色頭オオクマバチ(ベスブラマクラ: *Vespa maculata*))、及びスズメバ

チ(ベスブラアレナリア: *Vespula arenaria*) (ref. nr. MH01)

スズメバチ科混合物(スズメバチ、白色頭オオクマバチ及びスズメバチ)(ref. No. MV02)。

コントロール動物は以下のコントロール溶液を受けた:

NaCl: 0. 12M

ヒト血清アルブミン(HSA): 0. 03%

マシニール: 3%

リン酸ナトリウム: 0. 005M

pH: 4

試験の準備

これらの毒素を種々の濃度においてエバン(Evan)の硬質食塩水、pH7に、各投与時に同一の投与量、即ち、0. 5ml/動物を確保するために希釈せしめた。

NaHPO₄ · 2H₂O: 0. 711g/L

KH₂PO₄: 0. 363g/L

NaCl: 5g/L

フェノール: 4g/L

ジ-Na-EDTA · 2H₂O: 0. 1g/L

動物及び条件

動物: マウス、NMRI種、SPF (Anticimex, Norrviken)、生後7週間、体重(♀) 25g、(♂) 30g、5匹/ケージで飼育。

えさ: 任意量のペレット (Anticimex, R3) 及び水。

ムスケジュールに従ったが、それらはグループ2及び3と同一のマシニール及びHSAの相対濃度を含むエバンの硬質食塩水に希釈せしめたコントロール溶液0. 5ml/一匹を各時点にて受けた。

投与のルート

背の中央の腰背部に皮下的に投与。

観察

不健康又は毒性の臨床徴候をコントロールし、そして毎日記録した。

体重

個体の体重を投与開始前及び各投与の後に記録した。

最終試験

50µg注射を開始してから6ヶ月後、全てのマウスを殺し、そして解剖した。組織学的調製品及び組織病理学検査のための組織を以下の器官から採取した: 皮膚、だ液腺、気管、肺及び気管支、心臓及び大動脈、甲状腺、副甲状腺、食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、腸間膜のリンパ腺、肝臓、胆嚢、大腸筋、座骨神経、胸骨分節、胸腺、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、精囊、前立腺、精囊、卵巣、子宮、陰、下咽、目、骨髄及び注射部。

結果

検査の結果のそれぞれのデータを図35-41Aに示した。

臨床徴候

臨床徴候

マウス、309号(オオクマバチ混合物)はこの実験期間

温度(周囲): 22±1℃。

湿度(相対): 50±10%。

光(人工): 12時間/日。

グループのサイズ

10匹ずつの動物(各性5匹ずつ)をランダムに選別して5つのグループに分けた(1組のコントロールグループを含む)。

グループ	マウスNo.	化合物
1	1-10	コントロール
2	101-110	ハチミツバチ
3	201-210	スズメバチ
4	301-310	オオクマバチ混合物
5	401-410	スズメバチ科混合物

投与量

No. 2-5の各グループに、以下の投与スケジュールを利用した。

日	0	1	µg	毒素/動物
"	4	2. 5	"	"
"	7	5	"	"
"	12	10	"	"
"	14	25	"	"
"	16	50	"	"

その後、各マウスは毎月50µgの毒素を5ヶ月間受けた。従ってこの実験期間中に各マウスの注射された毒素の量の合計は343. 5µgであった。コントロール動物も同じタイ

最後の2ヶ月間、連続的に円運動するようになった。

マウス、203号(スズメバチ)はこの実験の終了1ヶ月前の短い間、脱毛を伴った水腫状且つたれた前足を有した。注: 図36-40を参照のこと。

体重は投与の影響を受けなかった。

最終試験

肉眼的病理学

脾臓はマウス304号(オオクマバチ混合物)において腫型に、そしてマウス406号(スズメバチ科混合物)において脾臓に固く付着していた。マウス101号及び105号(ハチミツバチ)はそれぞれ固い、1mmの小塊をその脾に有していた。その他の顕著な肉眼的発見はできなかった。注射部位は膨潤又はその他の変化を伴うことなく、殺傷時のままであった。

組織学的病理学

組織学的検査の結果を図41及び41Aに示した。腸間膜のリンパ腺における反応性壊死が以下のマウスに見られた: 110号(ハチミツバチ)、307号及び308号(オオクマバチ混合物)、406及び410号(スズメバチ科混合物)。マウス210号(スズメバチ)において、その腸間膜リンパ腺に中程度のリンパ球過形成が生じていた。

マウス310号(オオクマバチ混合物)において、その脾臓に亜急性又は慢性細胞反応を伴う病巣壊死があった。マウス304号(オオクマバチ混合物)において、脾臓から腫型にかけての付着に慢性的な壊死形成によるものであり、そし

マウス406号(スズメバチ科混合物)における脾臓から脾臓にかけての付着は慢性繊維形成によるものであり且つよく血管化(vascularized)されていることが見い出された。

腸間膜リンパ腺及び脾臓における上記の変化は感染系により引き起こされたものでありうるが、しかしそれらは動物の健康状態に顕著な悪影響を及ぼさないと判断される。

肺において小さな腫瘍が、マウス101号及び105号(ハチミツバチ)並びにマウス402号(スズメバチ混合物)において見られた。マウス407号(スズメバチ混合物)において、小さな結節性気管支上皮過形成が見られた。これらのタイプの変化は自発的に生じる。

コントロールマウス及びこれらの毒素の付与されたマウスにおいて、わずかな細胞浸潤物を有する肝実質細胞(hepatic parenchymal cells)の小さな壊死がしばしば見られた。更に、若干の慢性炎症変化が3匹のコントロールマウスにおける腎臓に見られた。

ローシャー(Rauscher)白血病マウスにおける生体内実験

ローシャー白血病マウスは一般に認められている哺乳類のレトロウイルス感染症のモデルである。このウイルスはマウスに赤血球生成白血病を生じさせ、これは赤血球の生産の増大の指標としての脾臓のサイズの増大により示される。脾臓のサイズは感染動物の死を実質的にもたらす疾患の進行の測定として取られる。6個のG1yの尾部を有するメリチン類似

体の作用をこのシステムにおいて試験した。

メリチンの抗ウイルス作用の原理の試験をBalsb Cマウスで行った(生後12週間;全て雄)。この動物をケージ当り4匹で飼育した。ローシャー白血球ウイルスによって、腹腔内注射によりこれらの動物を感染せしめ(一匹当り、0.2mlの容量において 10^8 個感染性粒子(ウイルス))、その10分後に試験物質を皮下注射せしめた。これらの動物はコントロール(食塩水の類似注射を受けたもの)又は試験動物(メリチン類似体を受けたもの)として2つのグループに分けた。

上記の通りに感染せしめたバルブCマウスそれぞれ16匹の2つのグループに、リン酸緩衝食塩水(2.5MのKH₂PO₄、150mMのNaCl、pH7.8;PBSと称す)又はメリチン-6-gly(0.1mlの容量において、5 μ g/体重 μ g)のいずれかを注射した。このペプチドは100 μ g/mlとして溶解せしめ、そしてコントロール及び試験動物のそれぞれは皮下的に同容量(0.1ml)のPBS又はPBS+試験物質を注射された。この注射は、感染性ウイルスの注射の10分後に行った。2日後、これらの動物は新たなメリチン類似体(10 μ g/体重 μ g)又はPBSの注射を、0.100mlの皮下注射として受けた。最初の注射から4日後、20 μ g/体重 μ gのメリチン類似体を用いて第3回目の注射を行った。全ての動物はメリチン類似体又はPBSの注射によって影響を受けることはなく、そして注射の厳しい期間を生じ続けた。

考察

全体的な印象は、マウスは4種の毒素、即ち、ハチミツバチ、スズメバチ、オオクマバチ混合物及びスズメバチ科混合物を少量の投与量生法において投与された場合にそれらに耐性であったことである。異常な肉眼的又は顕微鏡的変化は見い出せなかった。

初めに説明した通り、メリチンは哺乳類におけるHIV感染症の治療を、おそらく主要HIVタンパク質の1つ、即ち、糖タンパク質GP41との相互作用によって提供すると考えられる。このことは、GP41のトランスメンブレン領域とメリチンとの間の類似性により考えられ、そしてこのことは図5を参照することによって最もよくわかる。

図5において示す通り、GP41は分子の膜結合部の顯著な特徴でありうる両親媒性部位を有する。GP41の両親媒性部位は荷電アミノ酸の交差ループを形成し、ここでこのループの二本の脚部はメリチンの重合体に関連する構造と類似する電荷中和構造を形成せしめる。メリチンはGP41による分子内電荷中和の正常な形成も妨げ、これによってGP41の構造を大きく変化せしめる。このことはウイルスの形成に影響を及ぼし、その理由はウイルスの形成は基礎的なウイルス発芽プロセスを行えるようにするGP41とウイルスタンパク質P17の値との相互作用に依存すると考えられるからである。ウイルス、例えばHIVは、ウイルスゲノムを含む細胞表面の小さな膜芽(membrane bud)の形成を含むプロセスにより細胞から細胞へと広がるものと理

通常、感染マウスは2週間以内に150 μ g以上の重さの脾臓を生じせしめうる。このサイズは2.5g迄大きくなることができる。正常な脾臓は小さくて0.1 μ g、大きくて0.15 μ gであり、95%のマウスがこの範囲内の脾臓を有す。2週間後に170g以上の脾臓を明らかな感染症として解釈し、正常値の上限値150 μ gと170 μ gの間の脾臓をボーダーラインのケースとした。2週間後、コントロールグループにおいて試験した全ての動物は150 μ gより大きい脾臓を示した。試験した動物のテストグループの25%においても150 μ g以上であるが170 μ g以下の脾臓を示し、そしてこれらはボーダーラインケースとして考えられる。しかしながら、残りは脾臓の増大の徴候を示さず、即ち、それは正常な動物としての100~150 μ g内であった。1匹の動物のみがコントロールグループにおける100%と比較して病理的であった。

以下の考察が上記の実験から導かれる。

1. 動物は、本特許明細書に詳細のインビトロ実験と匹敵する濃度におけるメリチン類似体による処置に生存し続ける。
2. 該メリチン類似体は、哺乳類におけるレトロウイルスの発育を阻害する。なぜなら、比較処置したコントロールグループにおいて疾患は100%発症したのと比べ、感染動物の75%は疾患を発症せしめなかったからである。
3. HIVのみでなく、その他のレトロウイルスもメリチン及びその類似体により阻害される。

解されている。このプロセスは細胞表面の変化に感受性であると考えられる。例えば、脂質成分の添加は感染細胞からのウイルスの遊離を防ぐことがよく知られている。この作用はおそらく細胞膜上のカオトロピック作用に基づく。しかしながら、この作用のメカニズムは未だ明確でない。

メリチンの相互作用を可能にするGP41の構造的な特徴はアミノ酸770～856の間にあると考えられ、そしてここには770～794及び824～856の両親媒性配列が含まれる。図5を参照のこと。これらの配列の両親媒性は、低い全体的な疎水性と、組合さったそれらの高い疎水性運動により検出される。この二本の両親媒性部は分子力学によってモデル化され、そしてそれらはその両親媒性に基づいて相互作用することができ、これによってそれらはトランスメンブランループを形成することによって膜の中に侵入することが潜在的に可能となる。他方、それらは細胞膜の内部表面上に浮いていることもできる。どのケースにおいても、メリチンとの相互作用はGP41の細胞質部分の部位の位置を変化せしめ、これによってウイルス形成の重要な先駆体と考えられるp17との相互作用を防ぐ。これに関連して、メリチン及びGP41の両親媒性配列824～856の間の興味ある類似性は、それらが共にその両親媒性ヘリックスにおいてプロリンを有することにある。この構造的な特徴は初めに説明した通り、このヘリックスに120°のおじれを導入せしめ、従ってそれらがわずかに折り曲った形を有することを引き起こさせる。他方、メリチンは膜と相互作用することが

でき、これによってカオトロピック剤として働きうる。このことも、その両親媒性的性質によるであろう。カオトロピック剤の作用は膜に並んでいるリン脂質の配列の乱れを引き起こすことにあると考えられる。このような作用は膜の相転移期における変化及びその後のそれらの厚みの変化を引き起こす。期待された通りの、メリチンの浮化がカオトロピック効果を引き起こす事実は驚くべきことではない。しかしながら、この現象がどのようにしてウイルスの発芽プロセスに作用するかは不明確であり、そして現在定まっていない。しかしながら、大いなる抗HIV作用の機序又は変化が膜の脂質配列の並びにおいて生じた。更に、種々のリン脂質成分の添加も感染細胞からのHIVの遊離を防いだ。しかしながらこの作用を引き起こす脂質分子を特定することはできていない。

ところでメリチンはリン脂質と相互作用することが知られ、そしてこの未確認脂質分子のこの作用又はその結合はHIV遊離に関連するとも考えられ、これもメリチンの抗作用の説明を提供するであろう。おそらくこの脂質はリン脂質ではなく、その理由はリン脂質の添加はメリチンと非常に類似する作用を有すからである。

考察において、これらの試験結果はメリチンが二つの作用を有することを示唆する。即ち、メリチンはウイルスを不活性化せしめる短い第一期及び少なくともP24の生産を促める長い第二期を有すと考えられる。これらの特徴はメリチン両親媒性ヘリックスの特異的な構造に起因するであろう。更に、この試験の情報は、尾部構造が類似体の有効性を決定す

るがその作用の性質は決定しないことを示唆する。即ち、Lys-Arg-Lys-Arg-Gly-Glyを先端に含む尾部を有す類似体の有効濃度は該尾部を有さないメリチンの有効濃度の約100分の1である。上記の他、この試験結果は上清液の感染性が低毒性濃度でのメリチンによる単独処理によって引き下げられることを示唆した。これに関して、この処理は培養を開始することであり、そして感染性の測定は処理の7日後である。前記した通り、この型の培養物における最大ウイルス濃度値は培養の5日後に到達されなかった。本発明者が上記より導くことができる考察は、処理7日後の低められているウイルス感染性がウイルスにおけるメリチンの直接的な作用にのみ基づくならば、メリチン又は活性フラグメントの効果が処理の5日後のような遅さで現れていることと理解されるであろう。この可能性はなく、その理由は本発明者はメリチンが培養の開始後数時間以内に細胞によって吸収されることを発見したからである。更に、上清液の感染性の低下が、ウイルスの不適切な集積又は新たに合成されるビリオンの破壊と対立して、低められたウイルス生産に部分的に基づくなら、このような現象においてこれは細胞内及び/又はメリチン処理培養物の上清液中における低められたウイルスタンパク質の量に反映されるべきである。この仮説が正しいかを調べるため、本発明者はウイルスのタンパク質生産に関するマーカーとしてP24マーカーを選んだ。この試験データは、メリチンとの3時間のインキュベーションにより、細胞及び上清液のP24のあるにしてもほんのわずか

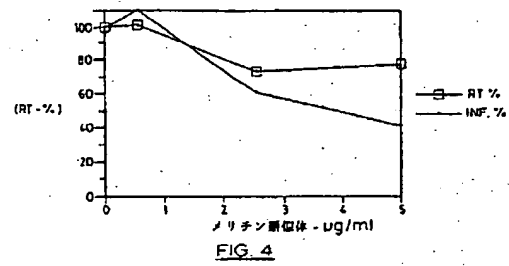
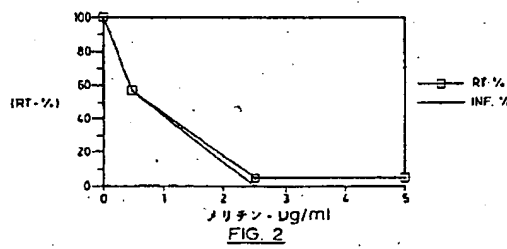
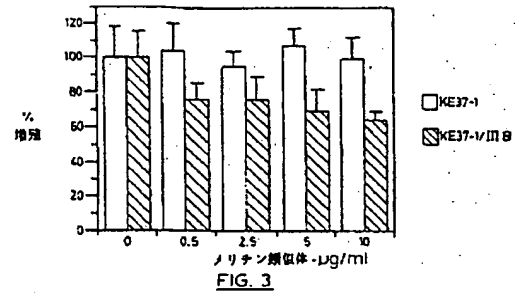
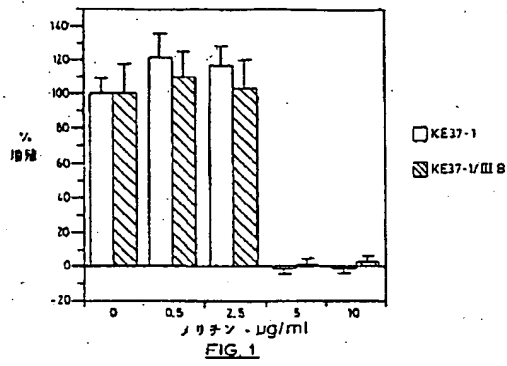
な低下のみを示した。しかしながら、メリチンとの14時間のインキュベーションによっては、細胞及び上清液におけるP24のめざましい低下が得られた(50%迄の低下)。そして、細胞P24は上清液P24よりも早く且つより強く引き下げられると考えられる。更に、メリチンとの無細胞HIVのインキュベーションはP24抗原の検出を弱めることはなかった。これはウイルスの感染性を引き下げることを引き起こすのみであると考えられる。

マウスにおけるインビトロ実験も実施した。

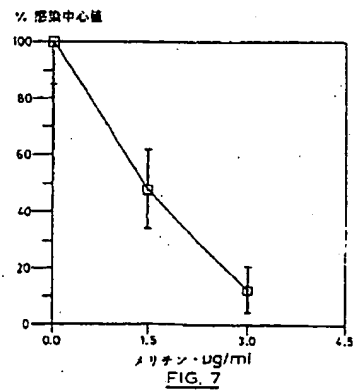
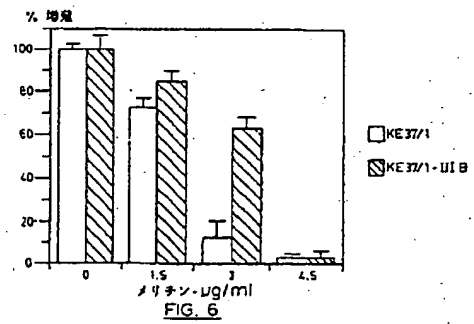
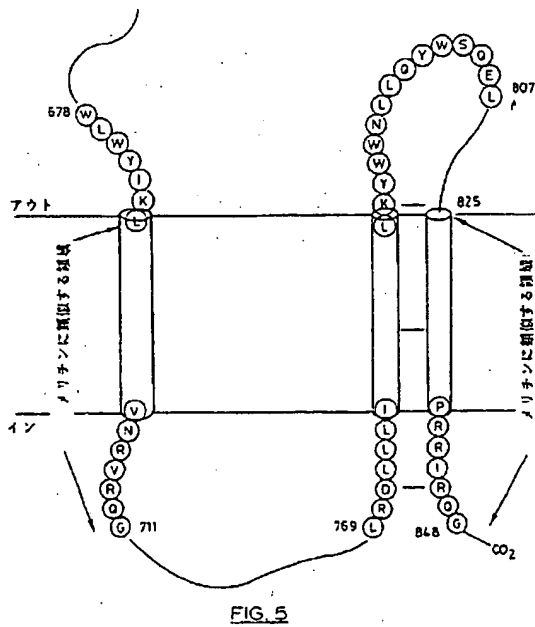
以下の考察が上記の実験から導かれる。

1. 動物は、本特許明細書に詳細のインビトロ実験と対比する濃度におけるメリチン類似体による処置に生存し続ける。
2. 胎メリチン類似体は、哺乳類におけるレトロウイルスの発育を阻害する。なぜなら、比較処置したコントロールグループにおいて疾患は100%発症したのと比べ、感染動物の75%は疾患を発症せしめなかったからである。
3. HIVのみでなく、その他のレトロウイルスもメリチン及びその類似体により阻害される。

本発明を最も実用的且つ好ましい態様において詳細に示したが、これらの改良を本発明の範囲を逸脱することなくなされることが理解できうる。



GP41のカルボキシ末端領域のモデル



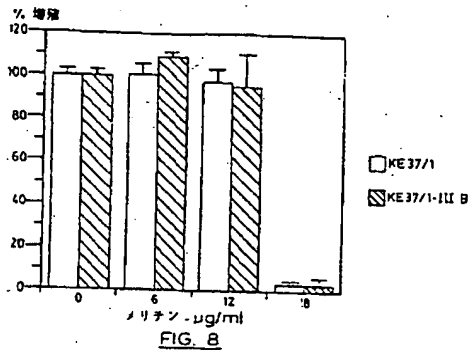


FIG. 8

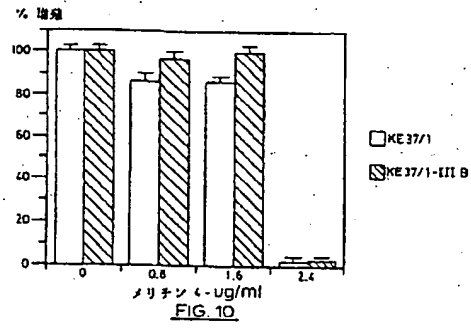


FIG. 10

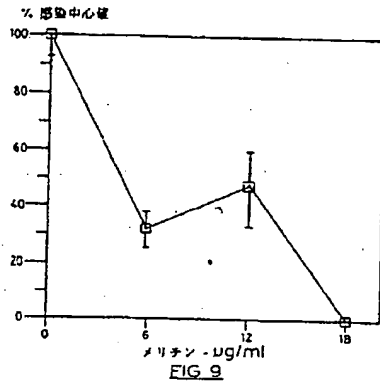


FIG. 9

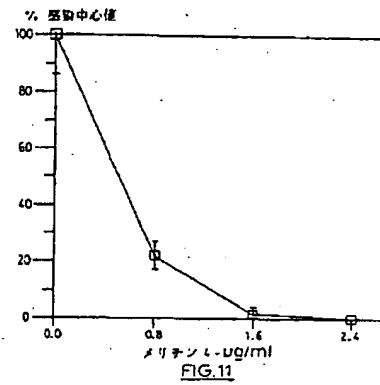


FIG. 11

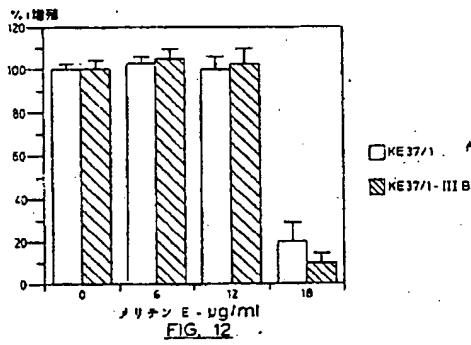


FIG. 12

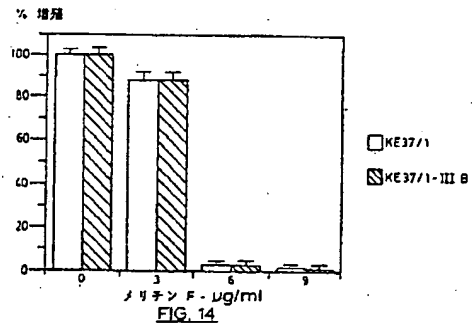


FIG. 14

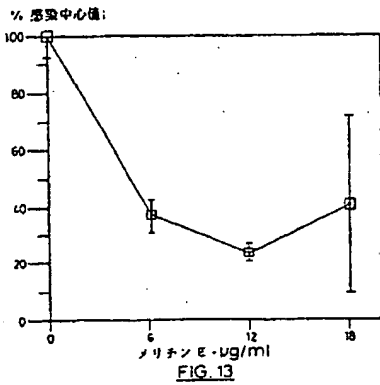


FIG. 13

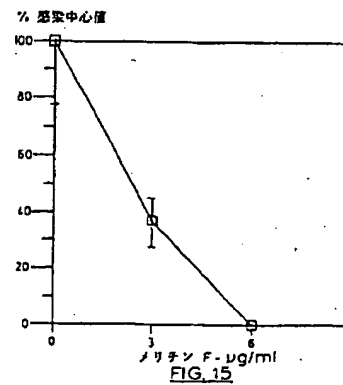
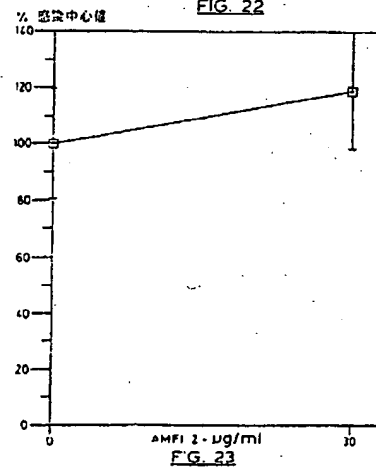
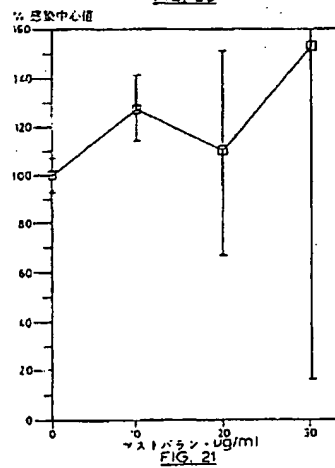
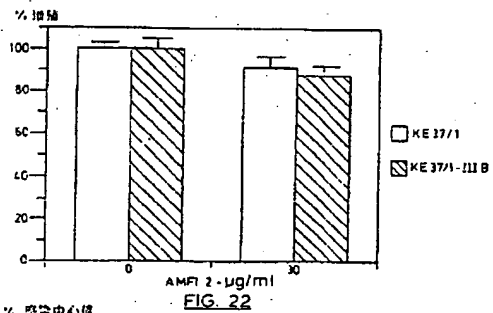
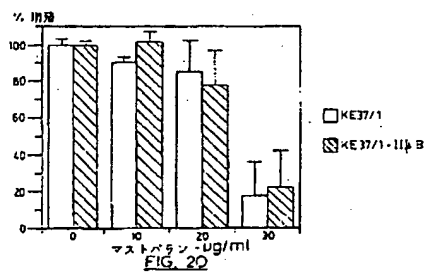
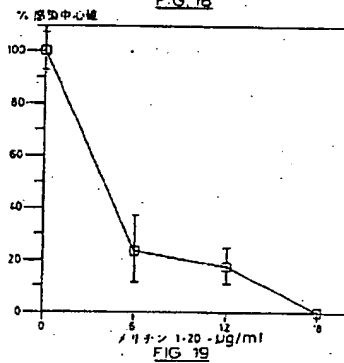
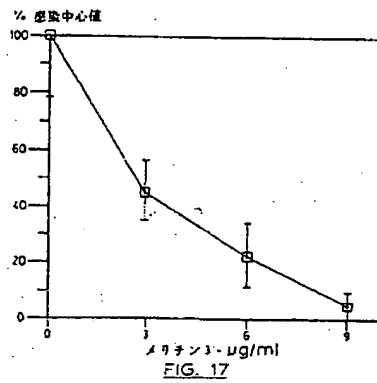
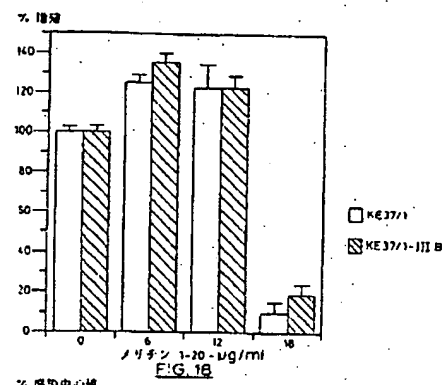
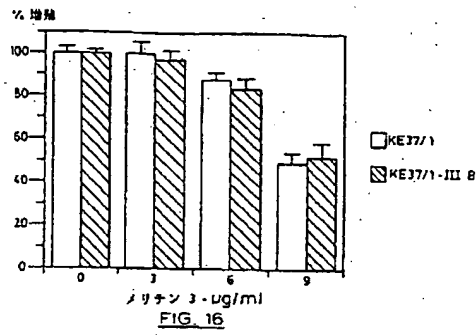
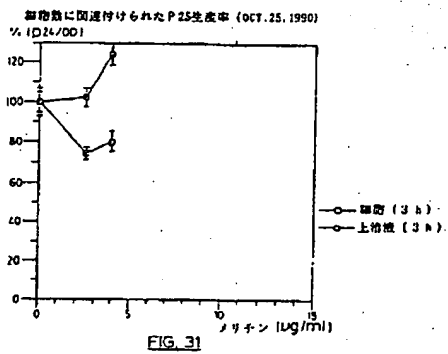
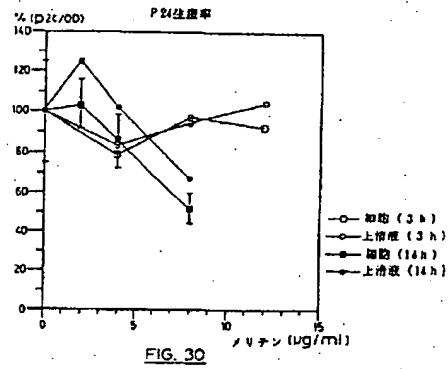
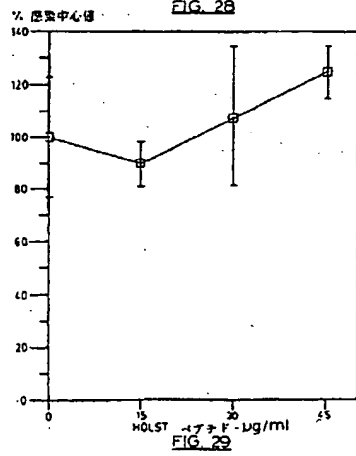
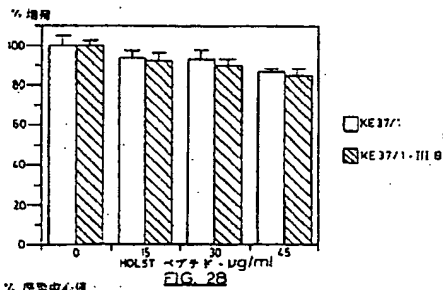
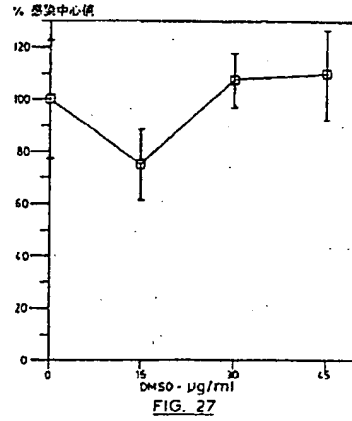
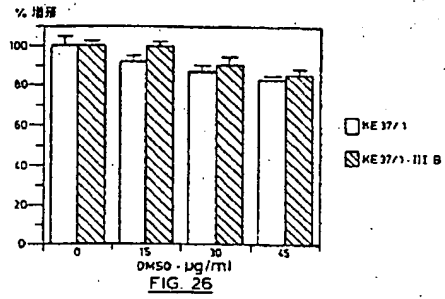
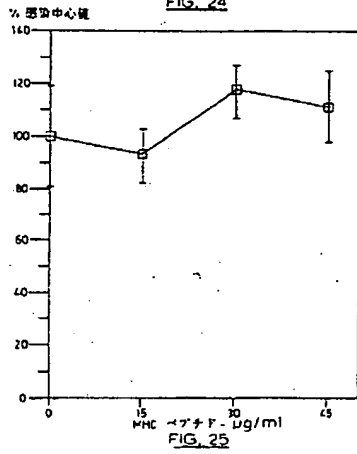
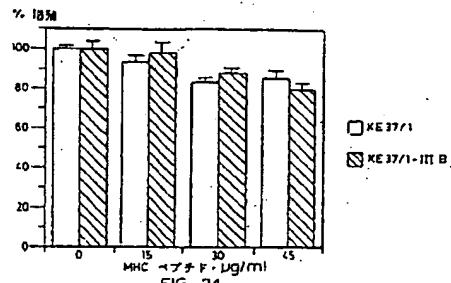


FIG. 15





メリチンとの3h及び14hのインキュベーション後の細胞及び上清液中のP24

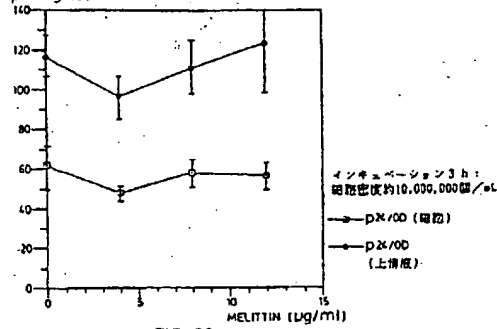


FIG. 32

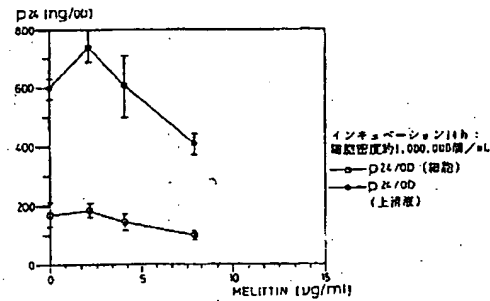


FIG. 33

無細胞HIV含有上清液におけるP24測定
へのメリチンの影響

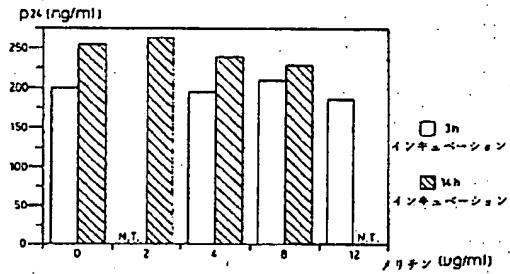


FIG. 34

FIG. 35

試験結果、長崎県試験センター
体重グラフ (g)
グループ平均データ

グループ	日	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	105	110	115	120	125	130	135	140	145	150	155	160	165	170	175	180	185	190	195	200	205	210	215	220	225	230	235	240	245	250	255	260	265	270	275	280	285	290	295	300	305	310	315	320	325	330	335	340	345	350	355	360	365	370	375	380	385	390	395	400	405	410	415	420	425	430	435	440	445	450	455	460	465	470	475	480	485	490	495	500	505	510	515	520	525	530	535	540	545	550	555	560	565	570	575	580	585	590	595	600	605	610	615	620	625	630	635	640	645	650	655	660	665	670	675	680	685	690	695	700	705	710	715	720	725	730	735	740	745	750	755	760	765	770	775	780	785	790	795	800	805	810	815	820	825	830	835	840	845	850	855	860	865	870	875	880	885	890	895	900	905	910	915	920	925	930	935	940	945	950	955	960	965	970	975	980	985	990	995	1000	1005	1010	1015	1020	1025	1030	1035	1040	1045	1050	1055	1060	1065	1070	1075	1080	1085	1090	1095	1100	1105	1110	1115	1120	1125	1130	1135	1140	1145	1150	1155	1160	1165	1170	1175	1180	1185	1190	1195	1200	1205	1210	1215	1220	1225	1230	1235	1240	1245	1250	1255	1260	1265	1270	1275	1280	1285	1290	1295	1300	1305	1310	1315	1320	1325	1330	1335	1340	1345	1350	1355	1360	1365	1370	1375	1380	1385	1390	1395	1400	1405	1410	1415	1420	1425	1430	1435	1440	1445	1450	1455	1460	1465	1470	1475	1480	1485	1490	1495	1500	1505	1510	1515	1520	1525	1530	1535	1540	1545	1550	1555	1560	1565	1570	1575	1580	1585	1590	1595	1600	1605	1610	1615	1620	1625	1630	1635	1640	1645	1650	1655	1660	1665	1670	1675	1680	1685	1690	1695	1700	1705	1710	1715	1720	1725	1730	1735	1740	1745	1750	1755	1760	1765	1770	1775	1780	1785	1790	1795	1800	1805	1810	1815	1820	1825	1830	1835	1840	1845	1850	1855	1860	1865	1870	1875	1880	1885	1890	1895	1900	1905	1910	1915	1920	1925	1930	1935	1940	1945	1950	1955	1960	1965	1970	1975	1980	1985	1990	1995	2000	2005	2010	2015	2020	2025	2030	2035	2040	2045	2050	2055	2060	2065	2070	2075	2080	2085	2090	2095	2100	2105	2110	2115	2120	2125	2130	2135	2140	2145	2150	2155	2160	2165	2170	2175	2180	2185	2190	2195	2200	2205	2210	2215	2220	2225	2230	2235	2240	2245	2250	2255	2260	2265	2270	2275	2280	2285	2290	2295	2300	2305	2310	2315	2320	2325	2330	2335	2340	2345	2350	2355	2360	2365	2370	2375	2380	2385	2390	2395	2400	2405	2410	2415	2420	2425	2430	2435	2440	2445	2450	2455	2460	2465	2470	2475	2480	2485	2490	2495	2500	2505	2510	2515	2520	2525	2530	2535	2540	2545	2550	2555	2560	2565	2570	2575	2580	2585	2590	2595	2600	2605	2610	2615	2620	2625	2630	2635	2640	2645	2650	2655	2660	2665	2670	2675	2680	2685	2690	2695	2700	2705	2710	2715	2720	2725	2730	2735	2740	2745	2750	2755	2760	2765	2770	2775	2780	2785	2790	2795	2800	2805	2810	2815	2820	2825	2830	2835	2840	2845	2850	2855	2860	2865	2870	2875	2880	2885	2890	2895	2900	2905	2910	2915	2920	2925	2930	2935	2940	2945	2950	2955	2960	2965	2970	2975	2980	2985	2990	2995	3000	3005	3010	3015	3020	3025	3030	3035	3040	3045	3050	3055	3060	3065	3070	3075	3080	3085	3090	3095	3100	3105	3110	3115	3120	3125	3130	3135	3140	3145	3150	3155	3160	3165	3170	3175	3180	3185	3190	3195	3200	3205	3210	3215	3220	3225	3230	3235	3240	3245	3250	3255	3260	3265	3270	3275	3280	3285	3290	3295	3300	3305	3310	3315	3320	3325	3330	3335	3340	3345	3350	3355	3360	3365	3370	3375	3380	3385	3390	3395	3400	3405	3410	3415	3420	3425	3430	3435	3440	3445	3450	3455	3460	3465	3470	3475	3480	3485	3490	3495	3500	3505	3510	3515	3520	3525	3530	3535	3540	3545	3550	3555	3560	3565	3570	3575	3580	3585	3590	3595	3600	3605	3610	3615	3620	3625	3630	3635	3640	3645	3650	3655	3660	3665	3670	3675	3680	3685	3690	3695	3700	3705	3710	3715	3720	3725	3730	3735	3740	3745	3750	3755	3760	3765	3770	3775	3780	3785	3790	3795	3800	3805	3810	3815	3820	3825	3830	3835	3840	3845	3850	3855	3860	3865	3870	3875	3880	3885	3890	3895	3900	3905	3910	3915	3920	3925	3930	3935	3940	3945	3950	3955	3960	3965	3970	3975	3980	3985	3990	3995	4000	4005	4010	4015	4020	4025	4030	4035	4040	4045	4050	4055	4060	4065	4070	4075	4080	4085	4090	4095	4100	4105	4110	4115	4120	4125	4130	4135	4140	4145	4150	4155	4160	4165	4170	4175	4180	4185	4190	4195	4200	4205	4210	4215	4220	4225	4230	4235	4240	4245	4250	4255	4260	4265	4270	4275	4280	4285	4290	4295	4300	4305	4310	4315	4320	4325	4330	4335	4340	4345	4350	4355	4360	4365	4370	4375	4380	4385	4390	4395	4400	4405	4410	4415	4420	4425	4430	4435	4440	4445	4450	4455	4460	4465	4470	4475	4480	4485	4490	4495	4500	4505	4510	4515	4520	4525	4530	4535	4540	4545	4550	4555	4560	4565	4570	4575	4580	4585	4590	4595	4600	4605	4610	4615	4620	4625	4630	4635	4640	4645	4650	4655	4660	4665	4670	4675	4680	4685	4690	4695	4700	4705	4710	4715	4720	4725	4730	4735	4740	4745	4750	4755	4760	4765	4770	4775	4780	4785	4790	4795	4800	4805	4810	4815	4820	4825	4830	4835	4840	4845	4850	4855	4860	4865	4870	4875	4880	4885	4890	4895	4900	4905	4910	4915	4920	4925	4930	4935	4940	4945	4950	4955	4960	4965	4970	4975	4980	4985	4990	4995	5000	5005	5010	5015	5020	5025	5030	5035	5040	5045	5050	5055	5060	5065	5070	5075	5080	5085	5090	5095	5100	5105	5110	5115	5120	5125	5130	5135	5140	5145	5150	5155	5160	5165	5170	5175	5180	5185	5190	5195	5200	5205	5210	5215	5220	5225	5230	5235	5240	5245	5250	5255	5260	5265	5270	5275	5280	5285	5290	5295	5300	5305	5310	5315	5320	5325	5330	5335	5340	5345	5350	5355	5360	5365	5370	5375	5380	5385	5390	5395	5400	5405	5410	5415	5420	5425	5430	5435	5440	5445	5450	5455	5460	5465	5470	5475	5480	5485	5490	5495	5500	5505	5510	5515	5520	5525	5530	5535	5540	5545	5550	5555	5560	5565	5570	5575	5580	5585	5590	5595	5600	5605	5610	5615	5620	5625	5630	5635	5640	5645	5650	5655	5660	5665	5670	5675	5680	5685	5690	5695	5700	5705	5710	5715	5720	5725	5730	5735	5740	5745	5750	5755	5760	5765	5770	5775	5780	5785	5790	5795	5800	5805	5810	5815	5820	5825	5830	5835	5840	5845	5850	5855	5860	5865	5870	5875	5880	5885	5890	5895	5900	5905	5910	5915	5920	5925	5930	5935	5940	5945	5950	5955	5960	5965	5970	5975	5980	5985	5990	5995	6000	6005	6010	6015	6020	6025	6030	6035	6040	6045	6050	6055	6060	6065	6070	6075	6080	6085	6090	6095	6100	6105	6110	6115	6120	6125	6130	6135	6140	6145	6150	6155	6160	6165	6170	6175	6180	6185	6190	6195	6200	6205	6210	6215	6220	6225	6230	6235	6240	6245	6250	6255	6260	6265	6270	6275	6280	6285	6290	6295	6300	6305	6310	6315	6320	6325	6330	6335	6340	6345	6350	6355	6360	6365	6370	6375	6380	6385	6390	6395	6400	6405	6410	6415	6420	6425	6430	6435	6440	6445	6450	6455	6460	6465	6470	6475	6480	6485	6490	6495	6500	6505	6510	6515	6520	6525	6530	6535	6540	6545	6550	6555	6560	6565	6570	6575	6580	6585	6590	6595	6600	6605	6610	6615	6620	6625	6630	6635	6640	6645	6650	6655	6660	6665	6670	6675	6680	6685	6690	6695	6700	6705	6710	6715	6720	6725	6730	6735	6740	6745	6750	6755	6760	6765	6770	6775	6780	6785	6790	6795	6800	6805	6810	6815	6820	6825	6830	6835	6840	6845	6850	6855	6860	6865	6870	6875	6880	6885	6890	6895	6900	6905	6910	6915	6920	6925	6930	6935	6940	6945	6950	6955	6960	6965	6970	6975	6980	6985	6990
------	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

FIG. 37

飼育母畜、黒川母性試験-マウス
体重グラム(g)
グループ平均データ

マウス No.	性別	授乳開始後の各日での体重(g)											(解乳) 200-1
		0	4	7	12	14	16	47	77	109	139	172	200-1
101	ハチスツハチ	29	38	39	30	28	29	21	21	34	24	33	33
102	"	31	32	31	32	33	33	29	24	40	43	43	37
103	"	21	31	31	32	32	32	29	22	34	38	32	36
104	"	30	36	31	31	31	30	32	32	32	35	36	36
105	"	30	30	31	32	32	32	29	26	39	41	36	38
106	"	24	32	34	34	35	35	28	26	38	20	28	28
107	"	24	34	34	36	36	36	37	37	38	38	30	38
108	"	24	32	33	33	33	34	24	27	28	27	28	31
109	"	26	27	26	27	27	26	30	32	32	33	32	33
110	"	34	34	35	34	35	35	26	26	28	30	30	34

FIG. 38

FIG. 39

飼育母畜、黒川母性試験-マウス
体重グラム(g)
グループ平均データ

マウス No.	性別	授乳開始後の各日での体重(g)											(解乳) 200-1
		0	4	7	12	14	16	47	77	109	139	172	200-1
301	ハチスツハチ	31	35	35	33	36	34	39	39	52	48	38	48
302	"	30	31	31	32	32	32	34	31	32	36	36	36
303	"	34	34	38	38	38	36	34	34	36	37	37	37
304	"	32	32	32	32	34	34	36	34	43	40	39	39
305	"	36	36	36	37	36	37	40	40	43	36	37	46
306	"	33	33	33	33	34	34	38	38	48	38	35	35
307	"	32	32	32	34	34	34	37	38	34	33	36	35
308	"	36	36	36	36	36	36	39	32	31	31	24	34
309	"	33	34	34	34	34	35	37	36	28	38	39	39
310	"	26	26	26	26	27	27	26	35	30	30	30	32

FIG. 40

FIG. 38

飼育母畜、黒川母性試験-マウス
体重グラム(g)
グループ平均データ

マウス No.	性別	授乳開始後の各日での体重(g)											(解乳) 200-1
		0	4	7	12	14	16	47	77	109	139	172	200-1
201	スズメバチ	29	34	35	35	36	37	34	39	40	49	37	38
202	"	30	30	30	30	31	31	31	29	35	34	34	35
203	"	32	32	32	33	33	33	33	32	39	37	37	39
204	"	31	31	32	32	32	32	33	33	34	37	36	37
205	"	30	30	30	30	30	30	29	28	30	34	31	34
206	"	32	32	32	32	32	32	34	34	36	36	29	27
207	"	29	34	35	35	35	35	35	37	39	30	31	32
208	"	32	32	34	34	35	35	37	39	30	32	30	33
209	"	32	35	35	35	36	36	37	39	39	28	28	35
210	"	26	27	27	27	28	28	28	28	30	30	31	30

FIG. 39

FIG. 40

飼育母畜、黒川母性試験-マウス
体重グラム(g)
グループ平均データ

マウス No.	性別	授乳開始後の各日での体重(g)											(解乳) 200-1
		0	4	7	12	14	16	47	77	109	139	172	200-1
401	スズメバチ	29	30	29	28	28	28	31	31	32	35	34	36
402	"	27	27	28	28	28	28	30	31	32	32	33	32
403	"	30	31	31	31	31	31	34	34	36	37	37	34
404	"	30	31	31	31	31	31	33	33	37	37	37	39
405	"	31	32	32	32	32	32	34	35	35	34	34	33
406	"	34	34	34	34	34	34	36	36	36	32	31	39
407	"	35	35	35	35	35	35	37	39	39	39	39	39
408	"	33	34	34	34	34	34	36	36	37	31	38	36
409	"	35	35	35	35	35	35	38	38	38	31	31	31
410	"	34	34	34	34	34	34	36	36	36	30	30	31

FIG. 40

FIG. 41 (その1)

膜翅類毒素、長期毒性試験—マウス、
新發現製薬

[illegible]

FIG. 41 (その2)

[illegible]

FIG. 41(その3)

[illegible]

組織学的に正常な耳奥を有する群智を \bar{r} で示した。正常からかけ離れている場合、次項においてそれを説明する。 \bar{r} で示した群智は組織学的に検査していない。

FIG. 41A

腹相親源系、長期毒性試験—マウス、

P 1 R. 41. ONEL

1. リンパ球細胞の病氣的な小さい増殖化。
2. おそらく気管支上皮に由来する小さな腫瘍。
3. 気管支上皮の小さな結節過形成。
4. 多核性顆粒球の浸潤を伴った小さく、古めかしい、そして見分けのつけられない壊死。
5. 多量の多形核の浸潤を有する病氣的な古めかしい壊死。
6. 多核性顆粒球の浸潤を伴う広範囲且つ不明瞭な壊死。
7. 中程度のリンパ系過形成。
8. わずかな細胞浸潤を有する数個の肝細胞の壊死。
9. 組織壊死により若干仕切られ、そして多形核及びマクロファージが多量に浸潤されている、病氣的壊死。
10. 若干の慢性腎盂腎炎。
11. 肺動脈への慢性繊維性付着。
12. 肺動脈への慢性繊維性付着及びよく血管化された付着。

利用したメリチン類似体及びその他のペプチド

1. Melittin:
Sequence: Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln-Amide.
2. Melittin acid:
Sequence: Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln-Amide.
3. Melittin 6:
Sequence: Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Lys-Lys-Lys-Gln-Gln-Amide.
4. Melittin 4:
Sequence: Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gly-Gly-Amide.
5. Melittin 2:
Sequence: Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Amide.
6. Melittin P:
Sequence: Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Ile-Ser-Trp-Ile-Orn-Orn-Amide.
7. Melittin 1-10:
Sequence: Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Ile-Ser-Trp-Ile-Amide.
8. Amfi 1:
Sequence: Gly-Thr-Asp-Arg-Val-Ile-Glu-Val-Val-Gln-Gly-Ala-Cys-Arg-Ala-Ile-Arg-His-Ile-Pro-Arg-Arg-Ile-Arg-Gln-Gly-Amide.
9. Amfi 2:
Sequence: Gly-Gln-Arg-Val-Arg-Asn-Val-Ile-Ser-Leu-Val-Ala-Phe-Val-Ile-Arg-Leu-Gly-Val-Leu-Gly-Val-Ile-Het-Ile-Phe-Amide.
10. HNC:
Sequence: Val-Ala-Ala-Lys-Ala-Asn-Arg-Val-Ala-Asp-Glu-Ile-Arg-His-Lys-Arg-Glu-Lys-Leu-Glu-Amide.
11. Molts:
Sequence: Phe-Ala-Gly-Ser-Gly-Val-Asp-Thr-Pro-Val-Phe-Asn-Ser-Tyr-Amide.

哺乳類のHIV感染細胞の増殖又は感染細胞におけるウイルスの複製を阻害する、哺乳類に低毒性有効投与量のメリチンを投与することを含む哺乳類HIV感染症の治療のための方法及び組成物について開示する。

補正書の翻訳文提出書
(特許法第184条の8)

平成4年6月5日

特許庁長官 深 沢 亘 殿

- 1 特許出願の表示
PCT/EP.90/02127
- 2 発明の名称
哺乳類のHIV感染症の治療のための方法及び組成物
- 3 特許出願人
住 所 ドイツ連邦共和国、デー-8042 ノイヘルベルク、
インゴルシュテットター ラントシュトラッセ 1
名 称 ゲーエスエフ・フォルシュングスツェンtrum
フュアウムベルド ウント ガズントハイム、
ガゼルシャフト ミット ベシュレンクテル
ハフツング
- 4 代 理 人
住 所 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号静光虎ノ門ビル
〒105 電話 (3504)0721
氏 名 井理士 (8579) 青 木 朗
(外3名)
- 5 補正書の提出年月日
1992年2月10日
- 6 添付書類の目録
補正書の翻訳文 1通

明 細 書

更に、この発明者は、メリチン類似体であって、少なくともその最後の6個のアミノ酸(C-末端)が変異して6個のグリシン残基に置き代わられているものの直接的な作用が、メリチンに類似する治療的利点を有することを発見している。このアミノ酸類似体は、Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Glyの構造を有す。

Merck Index (1983) 第10版、5643号にメリチンが抗-リウマチ剤として利用できることが更に知られる。

米国特許出願第 3,856,936号は、ココアバター脂肪酸との混合物における、有効量の全ハチ毒素及びメリチンより成る群から選ばれるものより成る、局所的利用による哺乳類におけるコルチゾールレベルコントロールのための組成物を開示している。

従って、腫瘍毒素又はそのタンパク質性もしくはポリペプチド成分、あるいはメリチンの複数の医薬用途が既に知られている。しかしながら、HIV感染症の治療のための医薬品の製造におけるメリチン又は腫瘍毒素の利用に関して述べている既知論文はない。

請求の範囲

1. 哺乳類のHIV感染細胞におけるウイルス複製を低める又は阻害せしめる哺乳類におけるHIV感染症の治療のための医薬の製造における、低毒性有効投与量のメリチンの利用。
2. 請求項1に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量のメリチンの構造類似体の利用。
3. 請求項1に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量のメリチン及びその構造類似体のポリペプチド混合物の利用。
4. 請求項1に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量の、少なくとも1種類の膜細胞毒素、少なくとも1種類の膜細胞毒素の活性タンパク質成分、少なくとも1種類の膜細胞毒素のポリペプチド成分、及びその混合物より成る群から選ばれる薬剤の利用。
5. 請求項1に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量の、ハチミツ毒素、マルハナ毒素、スズメバチ毒素、ボールドフェースオオクマバチ毒素、蜂毒素の活性タンパク質成分、蜂毒素の活性タンパク質成分、及びそれらの混合物より実質的に成る群から選ばれる薬剤の利用。
6. 請求項1に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量の、連結している細胞結合性配列を有する又は有さない両親水性 α -ヘリックスの利用。
7. 請求項1に記載の医薬品の製造における、低毒性有効

有効投与量の、ハチミツ毒素、マルハナ毒素、スズメバチ毒素、ボールドフェースオオクマバチ毒素、蜂毒素の活性タンパク質成分、蜂毒素の活性タンパク質成分、及びそれらの混合物より実質的に成る群から選ばれる薬剤の利用。

16. 請求項9に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量の、連結している細胞結合性配列を有する又は有さない両親水性 α -ヘリックスの利用。
17. 請求項9に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量のGly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly-Glyの利用。
18. 請求項9に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量のメリチン及びGly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly-Glyの構造類似体の利用。
19. 哺乳類のレトロウイルス感染細胞におけるウイルス複製を低める又は阻害せしめる哺乳類におけるレトロウイルス感染症の治療のための医薬の製造における、低毒性有効投与量のメリチンの利用。
20. 請求項19に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量のメリチンの構造類似体の利用。
21. 請求項19に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量のメリチン及びその構造類似体のポリペプチド混合物の利用。
22. 請求項19に記載の医薬品の製造における、低毒性

有効投与量のGly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Glyの利用。

8. 請求項1に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量のメリチン及びGly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Glyの構造類似体の利用。
9. 哺乳類におけるHIV感染細胞の増殖を低める又は阻害せしめる哺乳類におけるHIV感染症の治療のための医薬品の製造における、低毒性有効投与量のメリチンの利用。
10. 請求項9に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量のメリチンの構造類似体の利用。
11. 請求項9に記載の医薬品の製造における、Amf11及びメリチン様であるGP41のペプチドの利用。
12. 請求項9に記載の医薬品の製造における、Amf12及びメリチン様であるGP41のペプチドの利用。
13. 請求項9に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量のメリチン及びその構造類似体のポリペプチド混合物の利用。
14. 請求項9に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量の、少なくとも1種類の膜細胞毒素、少なくとも1種類の膜細胞毒素の活性タンパク質成分、少なくとも1種類の膜細胞毒素のポリペプチド成分、及びその混合物より成る群から選ばれる薬剤の利用。
15. 請求項9に記載の医薬品の製造における、低毒性有

有効投与量の、少なくとも1種類の膜細胞毒素、少なくとも1種類の膜細胞毒素の活性タンパク質成分、少なくとも1種類の膜細胞毒素のポリペプチド成分、及びその混合物より成る群から選ばれる薬剤の利用。

23. 請求項19に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量の、ハチミツ毒素、マルハナ毒素、スズメバチ毒素、ボールドフェースオオクマバチ毒素、蜂毒素の活性タンパク質成分、蜂毒素の活性タンパク質成分、及びそれらの混合物より実質的に成る群から選ばれる薬剤の利用。
24. 請求項19に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量の、連結している細胞結合性配列を有する又は有さない両親水性 α -ヘリックスの利用。
25. 請求項19に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量のGly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Glyの利用。
26. 請求項19に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量のメリチン及びGly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Glyの構造類似体の利用。
27. 哺乳類におけるレトロウイルス感染細胞の増殖を低める又は阻害せしめる哺乳類におけるレトロウイルス感染症の治療のための医薬の製造における、低毒性有効投与量のメリチンの利用。
28. 請求項27に記載の医薬品の製造における、低毒性

特表平5-504761 (22)

有効投与量のメリチンの精造類似体の利用。

29. 請求項27に記載の医薬品の製造における、Amf 11及びメリチン様であるGP41のペプチドの利用。

30. 請求項27に記載の医薬品の製造における、Amf 12及びメリチン様であるGP41のペプチドの利用。

31. 請求項27に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量のメリチン及びその精造類似体のポリペプチド混合物の利用。

32. 請求項27に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量の、少なくとも1種類の膜細胞毒素、少なくとも1種類の膜細胞毒素の活性タンパク質成分、少なくとも1種類の膜細胞毒素のポリペプチド成分、及びその混合物より成る群から選ばれた薬剤の利用。

33. 請求項27に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量の、ヘチミツ毒素、マルハナ毒素、スズメバチ毒素、ホールドフェースオオクマバチ毒素、該毒素の活性タンパク質成分、該毒素の活性タンパク質成分、及びそれらの混合物より実質的に成る群から選ばれた薬剤の利用。

34. 請求項27に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量の、連結している細胞結合性配列を有する又は有さない同親鎖性αヘリックスの利用。

35. 請求項27に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量のGly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Glyの利用。

36. 請求項27に記載の医薬品の製造における、低毒性有効投与量のメリチン及びGly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Glyの精造類似体の利用。

国際調査報告

International Publication No. PCT/EP 90/02127

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER	
Inventor: Int. Cl. 5 A 61 K 37/02	
B. FIELD OF INVENTION	
Int. Cl. 5 A 61 K	
C. SUMMARY OF THE INVENTION	
D. STATEMENTS OF PRIOR ART	
A	US, A. 3856936 (J.A. VICK et al.) 24 December 1974
E. CLAIMS	
F. ABSTRACT	

国際調査報告

EP 9002127
SA 62385

This report contains the prior art documents relevant to the present invention, as far as the prior art is known to the International Searching Authority. The documents are reproduced in the European Patent Office (EPO) as they are. The International Searching Authority is not responsible for the accuracy of the information.

Publication No.	Publication Date	Publication Title
US-A- 3856936	24-12-74	None

For more details about the prior art, see Official Journal of the European Patent Office, No. 13/91

特表平5-504761(23)

第1頁の続き

⑦発明者 サエルマルク、トルベン

スウェーデン国、エスー211 30 マルモエー、グスタフ アドル
フス トルク 43

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.